

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

**“Factibilidad de detección de *Trichinella spiralis* en carne
por clasificación de analogía espectral (SIMCA)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN ALIMENTOS**

PRESENTA

FABIÁN RICARDO GÓMEZ DE ANDA

Directores de Tesis:

Dra. Lidia Dorantes Alvares

Dra. Georgina Calderón Domínguez

México, D.F. Enero, 2012





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F., siendo las 12:00 horas del día 15 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Alimentos para examinar la tesis de titulada:

Factibilidad de detección de *Trichinella spirallis* en carne por clasificación de analogía espectral (SIMCA)

Presentada por el alumno:

GÓMEZ

Apellido paterno

DE ANDA

Apellido materno

FABIAN RICARDO

Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	1	2	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Lidia Dorantes Alvarez

Dra. Georgina Calderón Domínguez

Dra. Gloria Dávila Ortiz

Dr. Benjamín Noguera Torres

Dra. Tzayhri Guadalupe Gallardo Velázquez

Dr. Gustavo Fidel Gutiérrez López

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Manuel Jesús Piñón López





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

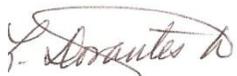
En la Ciudad de México, D.F., el día 15 del mes de diciembre del año **2011**, el (la) que suscribe **Fabián Ricardo Gómez de Anda** alumno (a) del Programa de **Doctorado en Ciencias en Alimentos** con número de registro **A080126**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dra. Lidia Dorantes Alvarez y Dra. Georgina Calderón Domínguez** y ceden los derechos del trabajo intitulado: **“Factibilidad de detección de Trichinella spirallis en carne por clasificación de analogía espectral (SIMCA)”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: fabirico78@hotmail.com; ldoran@ipn.mx; gcalderon@ipn.mx; si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



M.V.Z. Fabián Ricardo Gómez de Anda

Vo. Bo


Lidia Dorantes Alvarez
Director de Tesis


Dra. Georgina Calderón Domínguez
Director de Tesis



Ms. Ref. No.: MEATSCI-D-11-00481

Title: Determination of *Trichinella spiralis* in pig muscles using Mid-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (MID-FTIR) with Attenuated Total Reflectance (ATR) and Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA).

Meat Science

Dear Lidia,

Reviewers have now commented on your paper. You will see that they are advising that you revise your manuscript. If you are prepared to undertake the work required, I would be pleased to reconsider my decision.

For your guidance, reviewers' comments are appended below.

If you decide to revise the work, please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript. If you cannot submit your revision within 90 days, please inform the editor; otherwise your manuscript may be withdrawn from consideration.

To submit a revision, please go to <http://ees.elsevier.com/meatsci/> and login as an Author.

Your username is: dorantes

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/meatsci/automail_query.asp

On your Main Menu page is a folder entitled "Submissions Needing Revision". You will find your submission record there.

Yours sincerely,

Elisabeth Huff-Lonergan, PhD

Associate Editor

Meat Science

Reviewers' comments:

Reviewer #1: The manuscript is easy to follow and it appears a case has been made for the usefulness of FTIR-HATR in the detection of *T. spiralis*.

I suggest the following changes to the figures and tables.

Figure 1 - Use separate symbols for each treatment and darken the plot lines.

Figure 2 - I suggest the data for pigs 1-5 be incorporated in a table. That would be much easier to comprehend rather than going through five histograms.

Figure 3 - Is there some way to get all of these into one large figure? As is it will be hard to read in a completed manuscript.

Figure 4 - Label each spectra with the larva levels.

Figure 5 - This needs more explanation on the figure legend. Is there some way to group all these together into one figure. As is it is seven separate figures.



Elsevier Editorial System(tm) for Meat Science
Manuscript Draft
Manuscript Number: MEATSCI-D-11-00481R1

Title: Determination of *Trichinella spiralis* in pig muscles using Mid-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (MID-FTIR) with Attenuated Total Reflectance (ATR) and Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA).

Article Type: Research Paper

Keywords: *T.spiralis*; MID-FTIR; pig meat

Corresponding Author: Dr. Lidia Dorantes-Alvarez, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN

First Author: Fabiàn Gòmez- De- Anda

Order of Authors: Fabiàn Gòmez- De- Anda; Lidia Dorantes-Alvarez, Ph.D; Tzayhri Gallardo-Velázquez , PhD; Guillermo Osorio-Revilla , PhD; Georgina Calderón-Domínguez , PhD; Pablo Martínez Labat , Phd; Jorge-Luis de-la-Rosa-Arana , Msc

Abstract: The aim of this work was to study the feasibility of detection of *Trichinella spiralis* in swine meat using Middle Infrared Spectroscopy Fourier Transform with Attenuated Total Reflectance (ATR) and Soft Independent Modeling of Class Analogy (MID-FTIR-ATR-SIMCA). Five male Pigs were orally infected at different larvae concentrations (13000, 6500, 3500, 1625, 812 larvae/pig) and after 24 weeks the animals were euthanized. Five types of muscles were studied (leg, loin, rib, masseter, and diaphragm). Results showed that MID-FTIR-ATR-SIMCA was useful to determine the presence of *T.spiralis* in the samples, as the interclass distance between infected and non infected muscles varied from 13.5 to 36.8. This technique was also useful to discriminate among pig muscles, where masseter showed the largest interclass distance, while rib presented the smallest one. In all cases the recognition and rejection rates was 100%, which means that the methodology is capable of accurately separate *T. spiralis* infected from non infected swine meat.

Suggested Reviewers:

LIST OF CHANGES MADE TO PAPER MEAT SCI-D-II-00481 (Attending the reviewers' comments) December 13th, 2011.

Figure 1 - Use separate symbols for each treatment and darken the plot lines.

We used separate symbols for each treatment to differentiate them and darkened the plot lines.

Figure 2 - I suggest the data for pigs 1-5 be incorporated in a table. That would be much easier to comprehend rather than going through five histograms.

The data of Figure 2 have now been incorporated in Table 2.

Figure 3 - Is there some way to get all of these into one large figure? As is it will be hard to read in a completed manuscript.

As Figure 2 has been eliminated (data incorporated in Table 2), Figure 3 is now Figure 2. As the reviewer suggested, all the spectra of the five different swine muscles were included and/or represented in this Figure. Different letters are used to represent each muscle.

Figure 4 - Label each spectra with the larva levels.

Figure 4 is numbered as Figure 3 and each spectrum was labeled with the corresponding larva levels.

Figure 5 - This needs more explanation on the figure legend. Is there some way to group all these together into one figure. As is it is seven separate figures.

Figure 5 is Figure 4 now. Data in Figures 5 and 6 were now grouped in Figure 4. Also, legend for this Figure was changed and appears as shown next so as to expand information given.

Component analysis score plots generated by the optimized SIMCA models for infected and non infected pig muscles (a-e). Scores plots showing clusters and corresponding to the five non- infected and infected muscles may be observed in f and g plots respectively.

The numbers of Figures and Tables were also changed in the Text of the Manuscript.



HIGHLIGHTS PAPER MEATSCI-D-11-00481

- MID-FTIR-ATR-SIMCA was useful to determine the presence of *T. spiralis* in pig meat infected samples.
- This technique can be used to discriminate among different infected pig muscles.
- Masseter showed the largest interclass distance while rib presented the smallest one.
- The methodology is capable of accurately separate *T. spiralis* infected from non-infected pig meat.

1 **Determination of *Trichinella spiralis* in pig muscles using Mid-Fourier Transform**
2 **Infrared Spectroscopy (MID-FTIR) with Attenuated Total Reflectance (ATR) and**
3 **Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA)**

4
5 Gómez-de-Anda Fabián^{1,3}, Dorantes-Álvarez Lidia^{1*}, Gallardo-Velázquez Tzayhri¹

6 Osorio-Revilla Guillermo¹, Calderón-Domínguez Georgina¹, Martínez Labat Pablo², de-
7 la-Rosa-Arana Jorge-Luis³.

8

9 ¹Departamento de Graduados e Investigación de Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias
10 Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala,
11 México D.F. 11340, México

12

13 ²Departamento de Parasitología Veterinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán,
14 Universidad Autónoma de México.

15

16 ³Laboratorio de Helmintos Tisulares, Instituto de Diagnóstico y Referencia
17 Epidemiológicos, Secretaría de Salud, México, México.

18

19 *Corresponding author e-mail: ldoran@ipn.mx

20

21

22

23

24

25

26

27 **Abstract**

28 The aim of this work was to study the feasibility of detection of *Trichinella spiralis* in
29 swine meat using Middle Infrared Spectroscopy Fourier Transform with Attenuated Total
30 Reflectance (ATR) and Soft Independent Modeling of Class Analogy (MID-FTIR-ATR-
31 SIMCA). Five male Pigs were orally infected at different larvae concentrations (13000,
32 6500, 3500, 1625, 812 larvae/pig) and after 24 weeks the animals were euthanized. Five
33 types of muscles were studied (leg, loin, rib, masseter, and diaphragm). Results showed that
34 MID-FTIR-ATR-SIMCA was useful to determine the presence of *T. spiralis* in the
35 samples, as the interclass distance between infected and non infected muscles varied from
36 13.5 to 36.8. This technique was also useful to discriminate among pig muscles, where
37 masseter showed the largest interclass distance, while rib presented the smallest one. In all
38 cases the recognition and rejection rates was 100%, which means that the methodology is
39 capable of accurately separate *T. spiralis* infected from non infected swine meat.

40

41

42

43 Key words: *T. spiralis*; MID-FTIR; pig meat

44

45

46

47

48

49

50

51 1. Introduction

52 Trichinellosis is a widespread parasitic disease caused by different genotypes of
53 *Trichinella*. It is common in animals and can be spread from its reservoir (wild animals) to
54 synanthropic and domestic animals, as well as people (Campbell, 1988). Several recent
55 reviews summarize the presence of trichinellosis in different countries, such as Argentina
56 (Ribicich et al. 2005), Hungary (Sreter et al. 2005), China (Liu & Boireau, 2002), Mexico
57 (Flisser et al. 2002) and Greece (Sotiraki et al. 2001), and mention that its prevalence is
58 larger in the developing nations, where socioeconomic and unsanitary conditions facilitate a
59 transmission environment (Clausen et al. 1996; Contreras et al. 1994).

60 In Mexico, there have been some outbreaks of this zoonotic disease, being considered, both
61 as a problem of economic nature and of public health, as it causes losses in livestock
62 (Cabral et al. 1990), while human acquires the trichinellosis infection through the ingestion
63 of foods, mainly raw or poorly cooked pork meat.

64 Currently, the common diagnosis methods of *T. spiralis* infected pig meat includes the use
65 of compression triquinoscopy and artificial digestion that follows the international,
66 European Community sanitary codes for exportation of swine meat (Regulation (EC) No
67 2075/2005 which lays down specific rules for official controls for *Trichinella* in meat).

68 Compression Trichinoscopy is based on a muscle biopsy (2 to 4 mm³), in which a piece of
69 tissue is pressed between two slides and observed under a microscope, revealing the
70 presence of larvae in highly infected samples (Viveros et al. 2001; Capo & Despommier,
71 1996; Pawlowski, 1983), and being considered the most direct measurement method. On
72 the other hand, artificial digestion requires an acid and enzymatic hydrolysis of a finely
73 minced meat portion, resulting in release of *T. spiralis* larvae, which makes their

74 microscopic identification easier (Dordevic, 1991). However, both techniques are time
75 consuming, laborious and require highly experienced and well trained professionals.
76 Others methods for *T. spiralis* identification include antigen detection techniques by
77 immunoassay, such as immunosorbent assay ELISA, which is based on the use of a
78 conjugate (antigen- antibody) linked to an enzyme so that the resulting product (total
79 conjugate) has immunological activity that allows the detection of a specific substrate, by a
80 colorimetric enzymatic reaction (Gottstein et al. 2009).
81 Nöckler et al. (2009) evaluated the methods ELISA and Western Blot (WB) to detect anti-
82 *Trichinella*-IgG in pigs, in terms of sensitivity and specificity; the study revealed a
83 sensitivity of 96.8% for the ELISA and 98.1% for the WB whereas the methods showed a
84 specificity of 97.9 and 100%, respectively.
85 One of the tools currently used in food analysis is Fourier Transform Infrared Spectroscopy
86 (FTIR) coupled to multivariate analysis. This technology offers a wide range of
87 possibilities to develop predictive models, both quantitative and qualitative, where the
88 composition of the samples can be obtained by means of chemometric analysis.
89 FTIR can be thought of a molecular “fingerprinting” method. An infrared spectrum
90 contains features arising from vibrations of molecular bonds, and specially the mid-infrared
91 region (MID; $4000-400\text{ cm}^{-1}$) is highly sensitive to the precise composition of the sample
92 being analyzed (Van de Voort and Isnail, 1991). MID-FTIR instrumentation in addition of
93 sampling accessories, such as the attenuated total reflectance (ATR) cells, has led to major
94 improvements by simplifying sample handling (Armenta et al. 2005; Gallardo et al. 2008).
95 In the ATR cell, the infrared radiation is not guided through the sample itself, but rather
96 through a crystal with high refractive index that is in contact with the sample (Etzion et al.

97 2004). The beam is reflected several times inside the crystal before being directed to the
98 detector. When the beam hits the reflecting surface, it penetrates into the sample up to a
99 depth of approximately 0.1λ , where λ is the wavelength of the radiation. For MID-FTIR,
100 the penetration depth is less than $10\ \mu\text{m}$, which is similar to a thin transmittance cell.
101 However, by comparison to transmission cells, repeatability is enhanced because sample
102 dimensions do not affect the optic path (Mizaikoff, 2002).
103 Classification of samples with slightly differences in their FTIR spectral signal due to
104 differences in their chemical composition can be carried out by class modeling techniques.
105 Classification methods such as Soft Independent by class analogy (SIMCA) is a supervised
106 pattern recognition classification technique and one of the most commonly used class-
107 modeling tools in chemometrics. This technique requires a previous knowledge about the
108 category membership of samples. Thus the classification model is developed on a training
109 set of samples with known categories, and the model performance is evaluated by the use of
110 a validation set comparing predictions with true categories. SIMCA develops a geometric
111 structure (so-called disjointed class models or hyper-boxes), which is built based on
112 principal component analysis (PCA) for each training set category, and the limits of the
113 hyper-boxes are defined to a specific level of confidence. When the values of independent
114 variables of a new sample are projected into the PC space of each class, the sample is
115 assigned to the class it fits, which in the present study could be infected meat or not
116 infected meat with *Trichinella*. Predetermined classes (infected and non infected muscle
117 swine meat) classified with a specific confidence limits (99%) are projected onto three-
118 dimensional principal component analysis scores plots, using the first three principal
119 component scores as axes, so the separation of classes could be easily visualized . SIMCA

120 models also provide interclass distances between classes. The larger the interclass distance
121 between two groups, the better separated the groups. As a rule of thumb, an interclass
122 distance higher than 3 indicates well-separated classes (He et al. 2007; Hernandez et al.
123 2010).

124 MID-FTIR spectroscopy coupled to SIMCA has been applied successfully for food quality
125 control (Hernandez et al. 2010), adulterant detection (Meza et al. 2010), origin
126 denomination of products, and more recently in the detection of residues of veterinary
127 medicinal products at ppb levels in food (Meza et al. 2011). However, to the authors'
128 knowledge, the application of MID-FTIR-ATR-SIMCA for the detection of *Trichinella*
129 *spiralis* in meat has not been developed, so the aim of this work was to determine the
130 feasibility of MID-FTIR- ATR to detect the presence of *T. spiralis* larvae in swine meat,
131 analyzing the incidence of *Trichinella spiralis* by soft independent modeling of class
132 analogy (SIMCA).

133

134 **2. Materials and methods**

135 2.1 Meat samples preparation.

136 2.1.1. Non infected pig meat.

137 Two York-Landrace non infected male pigs (4 weeks old, 10 ± 0.2 Kg) were fed, based on
138 their weight, with different types of food (Pig tech: 0-8Kg; Lechocina: 8-25Kg;
139 Desarrollina >25 Kg, Purina Cargill, México) during six months following the
140 specifications for the production, care and use of laboratory animals (Aluja., 2002) as
141 indicated by the Mexican regulation (NOM-062-ZOO-1999). Pigs were sacrificed, skinned,
142 de-boned and eviscerated. Five different muscles were obtained from the pig carcass non

143 infected, three of them were selected based on consumer preference (leg, loin, rib), while
144 the others two as the common ones used at the slaughterhouses to evaluate the sanitary
145 quality of the pig meat (masseter, diaphragm) as required by law (Federal Inspection Type,
146 TIF). The whole muscle piece was cut in portions and minced (Food processor, Moulinex,
147 France) Each sample (200g) was divided into three parts to be used in the different
148 analysis: artificial digestion (50g), trichinoscopy (50g) and MID-FTIR-ATR-SIMCA (50g).

149 2.1.2 Infected pig meat

150 Five male York-Landrace pigs, (4 weeks old, 10 ± 0.2 Kg) were orally infected with
151 different concentrations of *T. spiralis* larvae (13000, 6500, 3250, 1625, 812 larvae/pig)
152 Blood samples from the pigs were collected (jugular vein) once a week to monitor the
153 course of the infection by Elisa and Western blot analysis. After 24 weeks post-infection
154 the pigs were skinned, de-boned and eviscerated, according to Mexican regulation NOM-
155 194-SSA1-2004. The same types of muscles as obtained from non infected meat were
156 selected (leg, loin, rib, masseter, diaphragm), following the same methodology to obtain the
157 samples (Section 2.1.1.). The samples were analyzed by artificial digestion, trichinoscopy
158 and MID-FTIR-ATR-SIMCA, in five different muscles in the pig.

159 2.1.3 *T. spiralis* larvae preparation by artificial digestion.

160 *T. spiralis* muscle larvae (ML) were obtained by artificial digestion of muscle tissues from
161 infected rats as previously described by De la Rosa et al. (1996) and Forbes & Gajadhar.
162 (1999). Five male Wistar rats (250 g, 6 weeks old) were orally dosed with 23 larvae per
163 gram of body weight (equivalent to 6000 ± 250 ML per rat), using a syringe, and giving
164 only one dose. The larvae were supplied by the National Reference Institute (INDRE,
165 Méx). After 30 days post infection, the animals were euthanized, skinned, de-boned and

166 eviscerated, and then the carcasses were minced (Food processor, Moulinex, France).
167 Larvae were extracted from the minced carcasses using the artificial digestion technique,
168 where 250 g of the infected rat meat were added to 25mL of 6N HCl, and 1% pepsin
169 solution (E.C. 3.4.23.1, Pepsin from porcine gastric mucosa, Sigma Co., St. Louis, Mo.).
170 This suspension was mixed (Thermolayne, model s46725, 3500rpm) for 4 h at 37°C. After
171 this time, the material containing the larvae was filtered through three gauze layers to
172 eliminate large debris, and the suspension was allowed to settle (45 min), discarding the
173 supernatant. The larvae were collected and washed three times with a 0.01M saline PBS
174 solution (pH 7.2). Larvae were purified from the remaining fine debris through a dextrose
175 gradient (20, 40, and 80%) and then washed three times in sterile PBS and counted under
176 the microscope.

177 This same digestion procedure was followed to evaluate the quantity of *T.spiralis* muscle
178 larvae presented in the swine meat (Dordevic, 1991; De la Rosa et al. 1998; Nöckler et al.
179 2000).

180 2.1.4 Trichinoscopy.

181 A muscle sample (10g) was pressed by hand between two transparent slides (2cm x 6cm)
182 and viewed under an optical microscope (optical microscope LW Scientific) at 20X, and
183 40X (Capo & Despommier, 1996; Pawlowski, 1983).

184 2.1.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

185 This assay required to be carried out at different stages that include the preparation of
186 antibodies, antigens, and the evaluation *per se*.

187 Antibodies preparation: Blood samples (15 mL) were centrifuged (IEC, clinica center) for 5
188 min at 12,000 g and room temperature (24°C), reserving the supernatant that includes the
189 antibodies. They were stored under refrigeration conditions (4°C) until required.

190 Antigen preparation: *T. spiralis* antigens can be considered as parasite metabolism waste.
191 These compounds are excreted during the growing and development of the parasite under
192 control culture conditions.

193 *T. spiralis* larvae (10000 ML/ml), as obtained from artificial digestion, were cultured in
194 12.5 cm³ cell culture flasks filled with RPMI 1640 medium (Gibco BRL, Grand Island,
195 N.Y.) containing antibiotics (penicillin G, 100 U/mL; streptomycin, 100 mg/mL) and
196 incubated at 37°C in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO₂) for 48 h; afterwards the
197 sample was centrifuged (IEC, clinica center) for 5 min at 12,000 g and room temperature
198 (24°C); the supernatant was collected and centrifuged again (750 g for 15 min) and its
199 protein content was evaluated (Bradford methodology). To keep the antigen activity, a
200 protein inhibitor mixture (N-tosyl-L-phenylalanine-chloromethyl ketone and tosyl-L-lysine
201 chloromethyl ketone, 50 mg of each per mL, and phenylmethylsulfonyl fluoride, to obtain a
202 100 mM solution [final concentrations]) was added to samples and kept frozen at -70°C in
203 1 mL aliquots until used. These antigens were called extraction-secretion products (ESP)
204 (Dzbencki et al. 1994; Nöckler, 2009).

205 *ELISA*. Extraction-secretion products (ESP, 5µg/mL) were used to coat high-binding
206 polystyrene plates (Corning Costar, Cambridge, Mass.) during 18 h at 4°C. After washing,
207 each plate was blocked with 5% skimmed fat milk suspension (200µL/well) for 30 min at
208 37°C. Serum samples (antibody preparation 50 µL/well, diluted 1:1,000) were incubated for
209 30 min at 37°C. Specific antibodies were detected using anti-pig immunoglobulin G

210 peroxidase conjugate (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO; USA) diluted 1:1,000. Finally, a
211 substrate-chromogen solution (50 μ L/well) containing O-phenylenediamine (Sigma-
212 Aldrich) and H₂O₂ (50 μ L/well) was used to develop the reaction, which was then stopped
213 by adding 2N H₂SO₄ solution (50 μ L/well). Absorbance values at 490 nm were obtained
214 with an ELISA reader (Bio-Rad) (Tinoco et al. 2002; Hassan et al. 2010).

215 2.1.6 Western Blot assay (WB).

216 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis was carried out in a
217 miniprotean Bio-Rad equipment (Hercules, Calif.; USA). A low-molecular-weight standard
218 (Bio-Rad) was used as a marker. The ESP(s) were solubilized under reducing conditions
219 and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell). For
220 immunological reactions, the nitrocellulose membranes were blocked with 5% skimmed
221 milk overnight at 4°C and strips of 0.5 cm wide were cut. Strips were incubated for 2 h at
222 room temperature with the pool of serum samples corresponding to each experimental
223 group (diluted 1:500). After washing, strips were incubated for 2 h at room temperature
224 with the rabbit anti-rat immunoglobulin G peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich), diluted to
225 1:500; afterwards, the substrate-chromogen solution containing 4-chloro-1-naphtol and
226 H₂O₂ were added and left the reaction took place for 5 min. Then the reaction was stopped
227 with tap water (Su & Prestwood, 1991).

228 2.1.7 MID-FTIR spectra acquisition.

229 Spectra of the non-infected and experimental infected pig muscles samples were collected
230 at room temperature in a MID-FTIR spectrophotometer (Spectrum GX, Perkin Elmer
231 Massachusetts, USA) equipped with a deuterated triglycine sulphate detector. The sampling
232 station was equipped with an overhead attenuated total reflection accessory (ATR)

233 consisting of transfer optics inside a chamber through which infrared radiation was directed
234 to the detachable zinc selenide crystal mounted into a shallow for sample containment. The
235 crystal geometry was a 45° parallelogram with mirrored angled faces. Spectra were
236 acquired and processed with the Spectrum software version 3.01.00 (Perkin Elmer, Inc.).
237 Single beam spectra of the samples were collected against a background of air and
238 presented in absorbance units. The spectra were scanned over a wave number range of
239 4000-650 cm⁻¹, averaging 64 scans at a resolution of 4 cm⁻¹. Minced samples of infected
240 and non-infected swine muscles were applied to the ATR accesorie to give total crystal
241 coverage. The crystal was cleaned between successive samples with Extran® 10%
242 detergent, acetone, and finally rinsed with distilled water and dried with lens cleaning
243 tissue. The cleaned crystal was carefully examined visually to ensure that no residue from
244 the previous sampling was retained on the crystal surface and checked by the determination
245 of the background spectrum. Different data pre-treatments were applied to the spectra in
246 order to remove unwanted systematic variations such as: baseline shifts, scatter effects and
247 effects from uncontrolled external factors. The optimal pre-processing treatments in this
248 work, was carried out applying ambient filters (CO₂ and H₂O), a Savitzky-Golay filter with
249 9 smoothing points, first derivatives of the spectra and normalization using the
250 multiplicative scatter correction (MSC). Pre-treated spectra were then subjected to Soft
251 Independent Modelling of Class Analogy analysis (SIMCA).

252 2.1.8 Classification of infected and non infected pig meat samples using soft independent
253 modelling of class analogy (SIMCA).

254 The SIMCA method analysis was performed using the software Assure I. D. from Perkin
255 Elmer version 3.0.0132 (Massachusetts). This chemometric technique establishes a

256 principal component model for each class (f) non-infected pig muscle and (g) infected pig
257 muscle. Also, a second SIMCA model was developed to classify between all different
258 infected and all non infected types of pig muscles: loin, leg, rib, masseter and diaphragm, in
259 order to identify which type of muscle was being analyzed. Used to build 100 each
260 population samples for each muscle infected and non infected (100 spectrums).

261 Fifty spectra of both infected and non infected pig meat each muscle were used to validate
262 the SIMCA models. In order to obtain optimal calibration performance, it was required to
263 carefully select the proper spectral range(s) where informative spectral differences between
264 infected and non infected pig meat were available. Therefore, in this study, it was necessary
265 to find the spectral region best-suited for discrimination between infected and non infected
266 pig muscle. In this work the spectral range used for best discrimination was 1700-900 cm^{-1}
267 with a 4cm^{-1} interval. Performance of the developed SIMCA model was evaluated through
268 interclass distance between the infected and non infected pig meat, the three-dimensional
269 principal component analysis scores plot, and the recognition and rejection rates of the
270 samples used for the validation of the model.

271 2.1.9 Statistical analysis

272 Data were analyzed using Minitab 15.0 software for Windows (Analytical Software 2007)
273 applying ANOVA and Tukey's test for pairwise comparison of means as obtained from the
274 software. $P \leq 0.05$ was considered to be significant.

275

276 3. Results and discussion

277 The effect of muscle larvae concentration on the IgG antibody production is shown in
278 Figure 1, where as expected, no antibodies were found in the samples before infection (0

279 days). After infection, the IgG antibodies could only be detected after tree weeks (20 days),
280 and continued increasing their concentration with time. Regarding to larvae concentration
281 there was no-effect on the antibody production, which means that the degree of response
282 from pig was independent of the larvae doses. These results are in agreement with other
283 authors' reports, who which have indicated that anti-*Trichinella* antibodies were detected
284 only after 21 days post-inoculation (Gamble, 1996; van der Leek, 1992; Ribicich, et al.
285 2000; Beck et al. 2005). ELISA results were confirmed by Western Blot analysis (Table 1),
286 where three immunogenic bands (44, 49 y 55 KDa) associated with ESP antigen from *T.*
287 *spiralis* were obtained after 20 days post-infection. Moller et al. (2005) and Hassan et al.
288 (2010) reported three immunogenic bands of the same size as the ones obtained in this
289 work, but in an experiment carried out infecting mice.

290 trichinoscopy and Artificial Digestion methods

291 The differences between trichinoscopy and artificial digestion methods, for different
292 infected pork meat muscles, are presented in Table 2. Under this perspective, the ANOVA
293 analysis did not detect significant differences ($P = 0.725$) between both methods. A
294 multiple comparison test among the types of muscles was also carried out. These results
295 showed that two well defined groups can be obtained, one for rib, loin, and leg muscles
296 and the other for masseter and diaphragm, where statistical analysis showed no difference
297 in-between groups ($P > 0.05$). It was also possible to establish by Tukey's test that the major
298 difference obtained was in diaphragm and masseter muscles.

299 It can be also seen from these results that the largest proportion of *Trichinella* larvae was
300 found in the masseter and diaphragm muscles, while the quantity in the others was smaller.
301 Similar results were reported by Mikkonen et al. (2001), but in an experiment carried out

302 with dogs, where they cited that masseter and diaphragm showed the largest concentration
303 of *Trichinella* larvae post infection. Furthermore, both kinds of analysis were sensitive to
304 the larvae concentration, where the artificial digestion methodology showed larger values,
305 mainly with samples obtained from animals infected at higher doses.

306 FTIR-ATR spectra

307 The FTIR-ATR spectra of muscles (Figure 2) show peaks that depend on the molecular
308 bonds and functional groups that are present in the sample, thus all muscles have a "finger-
309 print" spectrum related to their chemical composition. Figure 2 shows the MID Infrared
310 spectra of infected and non-infected pig muscles (rib, loin, leg, masseter and diaphragm
311 respectively) in the range of 4000-900 cm^{-1} . All spectra show characteristic bands of the
312 presence of protein, fatty acids and glycogen. The MID infrared bands were assigned
313 according to literature reports (Meza et al. 2011). The first band (3600-3200 cm^{-1}) is due to
314 the presence of the vibration OH stretching of water, the two peaks at 2950-2850 cm^{-1}
315 correspond to C-H stretching bond of methyl and methylene groups. The small band at
316 1740 cm^{-1} can be attributed to the presence of triglyceride functional groups (C = O
317 stretching). In the selected region 1700-900 cm^{-1} for the SIMCA analysis, the
318 characteristics amide I band of proteins at 1632 cm^{-1} (C = O stretching) and the band of
319 amide II at 1547 cm^{-1} (N-H bending mixed with C-N stretching) can be observed. The
320 small band at 1396 cm^{-1} is due to COO^- stretching vibration of fatty acids and proteins.
321 Finally, the small bands in the region of 1200-900 cm^{-1} are attributed to carbohydrate such
322 as glycogen.

323 In Figure 3 is shown that the rise in intensity in the region of 1700-900 depends on the
324 number of larvae.

325 Discrimination of infected and non infected pig muscles by SIMCA.

326 Figure 4(a-e) shows the 3D- principal component analysis scores plots generated by the
327 optimized SIMCA models for the different infected and non-infected pig muscles, and
328 helps to visualize the class separation among them. The boundary ellipse around each
329 cluster represents the 99% confidence interval, and each data point inside the cluster
330 represents one pig muscle spectrum. As can be seen from Figure 4(a-e), good separation
331 among infected and non-infected pig muscle samples was achieved. These results show the
332 capability of SIMCA models to discriminate subtle spectral differences between infected
333 and non infected pig muscles and consequently the two clusters are separated in the 3D-
334 PCA scores plots.

335 SIMCA also gives information about the interclass distance, which indicates how far the
336 two classes are separated, the larger interclass distance between two groups, the better
337 separated the groups. These data are shown in Table 3, where it can be seen that masseter
338 muscle shows the largest interclass distance (36.8), while the rib muscle showed the
339 smallest one (13.5) but far away from 3 which has been reported by He et al. (2007) as the
340 minimum distance to consider a good separation among classes. This indicates that
341 masseter could be considered as the best muscle for parasite identification purposes.

342 However, diaphragm, leg and loin presented good interclass distance (30.5, 23.3, and 22.6
343 respectively), therefore they could also be considered for parasite identification purposes.

344 An important advantage of SIMCA is the ability not only to determine whether a sample
345 does belong to any of the predefined categories but also to determine if it does not belong
346 to any class. Class prediction in SIMCA could fall into two possible outcomes, (i) the
347 sample was properly classified into the predefined categories (pig muscle infected for *T.*

348 *spiralis* or non infected pig muscle) and (ii) the sample does not fit into any of the
349 categories which would imply that the meat sample is from a different source (De
350 Maesschalck et al. 1999).

351 The recognition rate (also known as the sensitivity) represents the percentage of spectra
352 belonging to the category being analyzed which are correctly identified by the
353 mathematical model, while the rejection rate (also known as the specificity) represents the
354 percentage of foreign spectra not belonging to the category that is being analyzed. The
355 larger the recognition rates the better the method. In this context, in Table 3 if the class
356 that is being analyzed is no infected leg, 100 spectra belong to this class, and therefore are
357 identified as non-infected leg, given 100% recognition (100 out of 100). Also, 100 spectra
358 do not belong to non-infected leg class and therefore are rejected given 100% rejection (100
359 out of 100). The same happens with the other classes (infected and non-infected loin, rib,
360 masseter, and diaphragm). According to Table 3 the SIMCA model classified correctly all
361 pig muscles classes, independently of the concentration of *T. spiralis* larvae used to infect
362 each pig (812-13000 larvae /pig)

363 Regarding the classification of the different muscles used in this work, a second SIMCA
364 model was developed and their 3D-PCA scores plots are depicted in Figure 4 (f) and (g).
365 As can be seen in this figure, all clusters belonging to the different muscles are well
366 separated. However the presence of *T. spiralis* in the muscles made the separation between
367 clusters less evident. Table 4 presents the Interclass Distance (ID) for the different type of
368 muscle (infected and non-infected). It can be observed in this Table that non infected meat
369 presented larger ID values between pig muscles types (17.6-30.6) as compared to infected
370 samples (9.9-17.5). The presence of the parasite is evident by the reduction of the interclass

371 distances between the muscles. This reduction of Interclass Distance maybe due to the
372 presence of low molecular weight carbohydrates such as of trehalose and tyvelose that have
373 been associated to the presence of the parasite presented in all muscles as an immunological
374 response (Goyal et al. 2002).

375 Results of the non-infected muscles Interclass distances shown in Table 4 indicate that the
376 larger distance was for loin and rib (30.6), while the smallest distance was obtained
377 between loin and masseter (17.6). In the case of infected muscles the largest distance was
378 that of leg-masseter (17.5), while the smallest was loin-masseter (9.9).

379 Table 5 shows the percentage of recognition and rejection rates for all samples (infected
380 and non-infected). As can be seen for all muscles types, both infected and non-infected, the
381 percentages of recognition and rejection of the 30 samples of the different muscles used as
382 external validation were 100% (30 out of 30). These results prove the capability of SIMCA
383 to distinguished between different muscles type either infected or non-infected with *T.*
384 *spiralis*.

385 **4. Conclusions**

386 The use of MID-FTIR-ATR in conjunction with SIMCA made possible to detect and
387 classify correctly different non-infected and infected with *Trichinella spiralis* pig muscles
388 (leg, loin, rib, masseter, and diaphragm). Compared to the conventional methods of analysis
389 for the determination of *Trichinella spiralis*, the main advantages of MID-FTIR-ATR-
390 SIMCA techniques are that it requires low sample volume, is environmentally friendly, due
391 to the fact that minimal or no sample preparation is required, which greatly speeds up
392 sample analysis (approximately 5 minutes compared with trichinoscopy and artificial

393 digestion methods approximately 30 minutes with respect to trichinoscopy and 3 1/2 hours
394 for artificial digestion).

395 The results showed that masseter could be considered as the best muscle for MID-FTIR-
396 ATR-SIMCA parasite identification purposes due to its high Interclass Distance with
397 respect to the other muscles. However, diaphragm, leg and loin presented good interclass
398 distances and therefore they could also be considered for parasite identification purposes.

399

400 **Acknowledgments**

401 This research was financially supported by projects SIP-IPN 20100575 and 20110813.
402 Fabián Gómez-De Anda wishes to thank IPN and CONACYT for the study grants, also to
403 R. Jimenez, V. Molina and the personal of the Tissular Helminths Laboratory for the
404 technical assistant and to I. Valle and M. Piñon for taking care of animals at InDRE
405 facilities.

406 **References**

407

408 Aluja, A. (2002). Laboratory animals and official Mexican norms (NOM-062-ZOO-1999).
409 Gaceta Médica de México, 138, (3) 295-298.

410

411 Armenta, G. S., Quintás, S. G., & de la Guardia M. (2005) Mid-infrared and Raman
412 spectrometry for quality control of pesticide formulations. Trends in Analytical Chemistry,
413 24, 772-781.

414

415 Beck, A., Gasparc, Z., Mihaljević, A., Marinculica, D. S., & Brstiloc, M. (2005)
416 Evaluation of ELISA for detection of Trichinella antibodies in muscle juice samples of
417 naturally infected pigs. Veterinary Parasitology, 132, 91-95.

418

419 Cabral, S. J., Villicaña, F. H., Fragozo, U. R., Contreras, A. (1990). Perfil epidemiológico
420 de la triquinosis en el estado de Zacatecas. Salud Pública México, 32, 575-582.

421

422 Campbell, W.C. (1988). Trichinosis revisited, another look at modes of transmission,
423 Parasitology Today, 4, 83-86.

424

425 Capó, V., & Despommier, D. D. (1996). Clinical aspects of infection with *Trichinella*
426 *spp.*, Clinical Microbiology. Rev, 9, 47-54.

- 427
428 Clausen, M. R., Meyer, C. N., Krantz, T., Moser, C., Gomme, G., Kayser, L., Albrechtsen,
429 J., Kapel, C.M., Bygbjerg, I.C. (1996). *Trichinella* infection and clinical disease. An
430 international Journal of Medicine , 89, 31-36.
431
432 Contreras, M. C., Schenone, H., Sandoval, L., García, M. (1994). Epidemiología de la
433 triquinosis en Chile. Estudio de la prevalencia mediante reacciones inmunológicas, Boletín
434 Chileno de Parasitología, 49,73-75.
435
436
437 De-la-Rosa J. L., Correa D. (1996). Longitudinal analysis of the humoral immune response
438 of rats experimentally infected with *Trichinella spiralis* by western blot. In: Ortega-Pierres
439 G, Gamble H R, van-Knapen F, Wakelin D, editors. Proceedings of the Ninth International
440 Conference on Trichinellosis. Mexico City, Mexico: Centro de Investigación y Estudios
441 Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 333–337.
442
443 De-la-Rosa, J. L., Aranda, J., Padilla, E., Correa, D. (1998). Prevalence and risk factors
444 associated with serum antibodies against *Trichinella spiralis*. International Journal of
445 Parasitology, 28, 317–321.
446
447 De Maesschalck, R., Candolfi, A., Massart, D. L., & Heureding, S. (1999). Decision criteria
448 for soft independent modeling of class analogy applied to infrared data. Chemometrics and
449 Intelligent Laboratory Systems, 47, 68-77.
450 Dordevic, M. (1991). Detection of *Trichinella* by various methods in Yugoslavia. Southeast
451 Asian Journal Tropical Medicine and Public Health, 22, (Suppl.) 326–328.
452
453 Dzbenski, T. D., Bitkowski, E., & Plonka, W. (1994). Detection of circulating antigen in
454 acute infections with *Trichinella spiralis*: diagnostic significance of findings. Zentralbl
455 Bakteriologie, 281, 519–525.
456
457 Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., & Shmulevich, I. (2004) Determination of protein
458 concentration in raw milk by mid-infrared Fourier transform infrared/attenuated total
459 reflectance spectroscopy. Journal of Dairy Science, 87, 2779–2788.
460 Flisser, A., Velasco, V. A., Martinez, C. C., Gonzalez, D. F., Briseno, G. B., Garcia, S. R.,
461 Caballero, S. A., Hernández, M. I., Garcia, L. H., Gutierrez, C. L. (2002). Infectious
462 diseases in Mexico. A survey from 1995–2000. Archives of Medical Research, 33, 343–
463 350.
464
465 Forbes, L. B., & Gajadhar, A. A. (1999). A validated *Trichinella* digestion assay and an
466 associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat.
467 Journal of Food Protection, 62, 1308-1313.
468
469 Gallardo, V. T., Osorio, R. G., Cárdenas B F., Beltrán O. M.(2008). Determination of
470 ternary solutions concentration in liquid-liquid extraction by the use of attenuated total

- 471 reflectance- Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate data analysis.
472 Canadian Journal of Chemical Engineering, 86, 77-83.
473
474 Gallardo, V. T., Osorio, R. G., Zúñiga, L. M., Rivera, E.Y. (2009). Application of FTIR-
475 HATR and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. J.
476 Food Research International, 42, 313-318.
477
478 Gamble, H.R. (1996). Detection of Trichinellosis in Pigs by Artificial Digestion and
479 Enzyme Immunoassay. Journal of Food Protection, 59(3), 295-298.
480
481 Gottstein, B., Pozio, E., & Nöckler, K. (2009). Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and
482 Control of Trichinellosis. Clinical Microbiology Reviews, 1 (22), 127-145.
483
484 Goyal, P., Whea tcraft, J., Wakelin, D. (2002). Tyvelose and protective responses to the
485 intestinal stages of *Trichinella spiralis*. Parasitology International, 51(1):91-8.
486
487 Hassan, E., Faragal, M., Moghazy, El., & Nagwa, I. T. (2010). Comparison of Two
488 Antigens for Diagnosis of Trichinellosis in Pigs. World Applied Sciences Journal, 8(4),
489 457-461.
490
491 He, J., Rodríguez, S. L., Giusti, M. M. (2007). Mid infrared spectroscopy for juice
492 authentication-rapid differentiation of commercial juices. Journal of Agricultural and Food
493 Chemistry, 55(11), 4443-4452.
494
495 Hernández, M. M., Gallardo, V. T., Osorio, R. G. (2010) Rapid characterization and
496 identification of fatty acids in margarines using horizontal attenuate total reflectance
497 Fourier transform infrared spectroscopy(HATR-FTIR).Euro Food Technology, 231, 321-
498 329.
499 Liu, M., & Boireau, P. (2002). Trichinellosis in China: epidemiology and control. Trends in
500 Parasitology, 18, 553-556.
501
502 Meza, M. O., Gallardo, V. T., & Osorio, R. G., (2010).Application of mid-infrared
503 spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies
504 (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. Meat Science,86, 2010, 511-519.
505
506 Meza, M. O., Gallardo, V. T., Dorantes, A. L., Osorio, R. G., de la Rosa, J. (2011) FT-MIR
507 and Raman spectroscopy coupled to multivariate analysis for the detection of clenbuterol
508 in murine model. Analyst 136, 3355-3365.
509
510 Mikkonen, T. L., Oivanen, A., Näreaho, H., Helin & Sukura, A. (2001). Predilection
511 Muscles and Physical Condition of Raccoon Dogs (*Nyctereutes procyonoides*)
512 Experimentally Infected with *Trichinella spiralis* and *Trichinella native*. Acta veterinaria
513 Scandinavica, 42, 441-452.

- 514
- 515 Mizaikoff, B., B. Lendl. (2002). Handbook of Vibrational Spectroscopy, J.M. Chalmers
516 and P.R. Griffiths (Eds), John Wiley & Sons, Ltd, 2, 1560-1573.
- 517
- 518 Moller, L. N., Petersen, E., Gamble, C., Kapel O. (2005). Comparison of two antigens for
519 demonstration of *Trichinella* spp. antibodies in blood and muscle fluid of foxes, pigs and
520 wild boars. *Veterinary Parasitology*, 132, (1-2), 81-84.
- 521
- 522 Nöckler, K., Pozio, E., Voigt, P., & Heidrich, J. (2000). Detection of *Trichinella* infection
523 in food animals. *Veterinary Parasitology*, 93, 335-350.
- 524
- 525 Nöckler, K., Reckinger S., Broglia, A., Mayer-Scholl, A., Bahn, P. (2009). Evaluation of a
526 Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. *Veterinary*
527 *Parasitology*. 163, 341–347.
- 528
- 529 Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la
530 producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- 531
- 532 Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004. Productos y servicios. Especificaciones
533 sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto
534 almacenamiento, transporte y expedición.
- 535
- 536 Pawlowski, Z. S. (1983). Clinical aspects in man, In W. C. Campbell (ed.), *Trichinella* and
537 trichinosis, Plenum Press, New York. 367– 402.
- 538
- 539 Regulation the commission of the european communities No 2075/2005 of the commission
540 of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for the presence of
541 *Trichinella* in meat.
- 542
- 543 Ribicich, M., Gamble, H. R., Rosa, A., Bolpe, J., & Franco, A. (2005). Trichinellosis in
544 Argentina: an historical review. *Veterinary Parasitology*, 132, 137–142.
- 545
- 546 Ribicich, M., Gamble, H. R., Santillan, G., Miguez, M., Molina, V., Guarnera, E., Basso,
547 N., Franco, A. (2000). Evaluation of ELISA test for the diagnosis of porcine trichinellosis.
548 *The Pig Journal*, 46, 24-34.
- 549
- 550 Sotiraki, S.T., Athanasiou, L.V., Himonas, C. A., Kontos, V. J., & Kyriopoulos, I. (2001).
551 Trichinellosis in Greece: a review *Parasite*, 8, 83–85.
- 552
- 553 Su, X., & Prestwood, A. K. (1991). A dot ELISA mimicry western blot test for the
554 detection of swine *Trichinella*. *Journal of Parasitology*, 77, 76–82.
- 555
- 556 Sreter, T., Szell, Z., & Varga, I. (2005). Current knowledge on human trichinellosis. *Orvosi*
557 *Hetilap*, 146, 117–125.



558 Tinoco, I., Velázquez, A., Gómez, P., Mendoza, R., & de-la-Rosa, J. (2002). Searching for
559 antibodies against *Trichinella spiralis* in the sera of patients with fever of unknown cause.
560 *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 96(4), 391–395.
561
562 Van der Leek, M., Dame, J., Adams, C., Gillis, K., Littell, R. (1992). Evaluation of an
563 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of trichinellosis in swine, *American*
564 *Journal of Veterinary Research*, 53 (6), 877-882.
565
566 Van de Voort, F.R. & Ismail, A.A. (1991). Proximate analysis of foods by mid-FTIR
567 spectroscopy. *Trends Food Science & Technology*, 2(1),13-17.
568 Viveros, N., Arriaga, C., Banda, V., Ortega, P., Yépez, L., (2001). Detection of *Trichinella*
569 infection in slaughter by artificial digestión, ELISA and PCR. *Parasite*, 8, 257-259.
570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584 CAPTIONS

585 Fig.1. Antibody response (ELISA) to *T. spiralis* infected pig samples. ML: muscle larvae.

586

587 Fig.2. FTIR-HATR spectra of different swine muscles infected or not infected with *T.*

588 *spiralis*. a) rib, b) loin, c) leg, d) masseter, e) diaphragm.

589

590 Fig.3. FTIR-HATR spectra pig loin infected with larvae of *T. spiralis* (13000, 6500, 3250,

591 1625, 812 larvae/) the arrow indicates the increase in the absorption bands with increasing

592 concentration of larvae.

593

594 Fig.4. Component analysis scores plots generated by the optimized SIMCA models for the

595 different infected and non infected pig muscles (a-e). Scores plots showing clusters

596 belonging to the five non- infected and infected muscles may be observed in f and g plots

597 respectively.

598

599

600

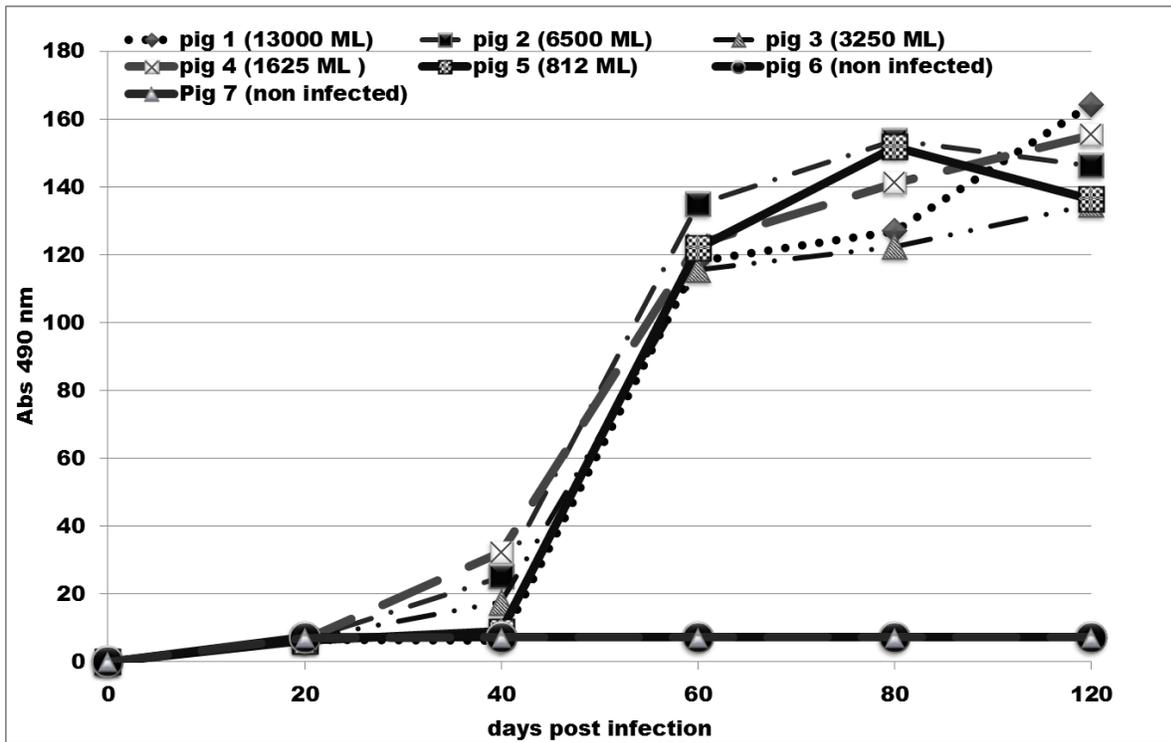
601

602

603

604

605 FIGURE .1



606

607

608

609

610

611

612

613

614

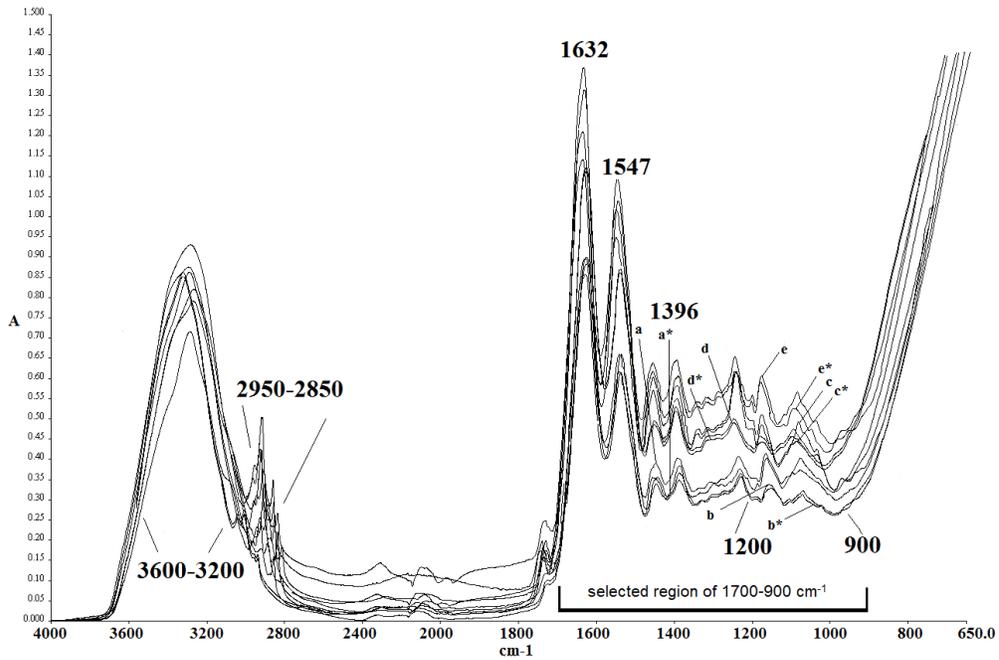
615

616

617

618

619 FIGURE 2.



infected muscles with larvae *T. spiralis*: (a) rib, b)loin, c)leg, d)masseter, e)diaphragm.
 non infected muscles: a*)rib, b*)loin, c*)leg, d*)masseter, e*)diaphragm.

620

621

622

623

624

625

626

627

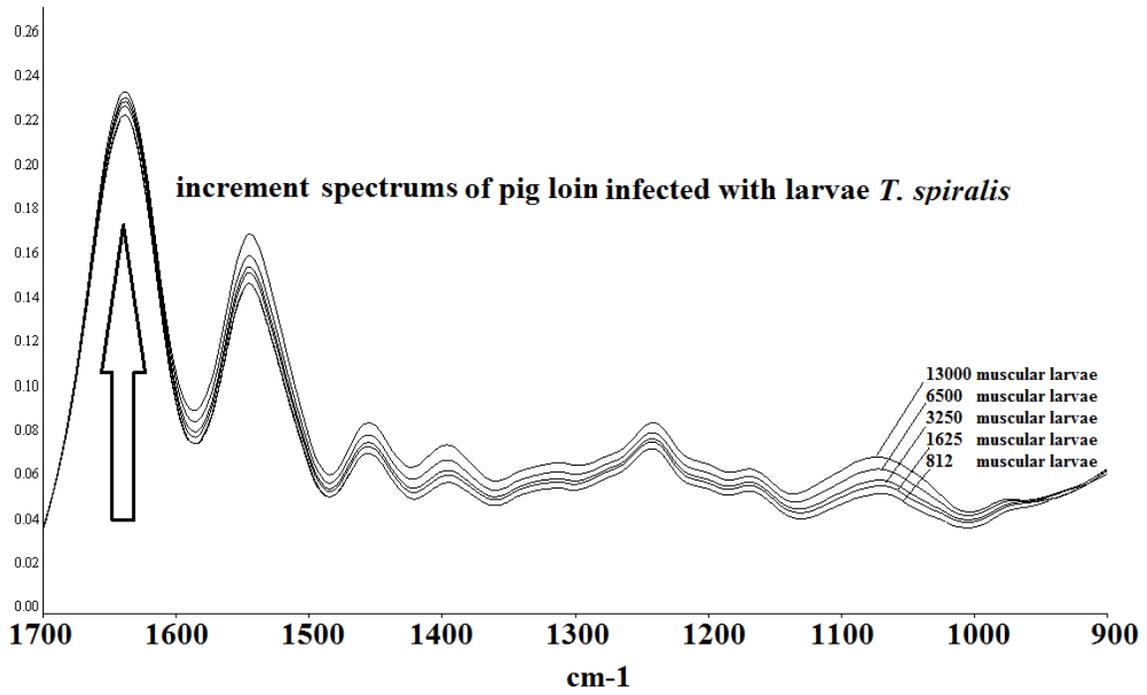
628

629

630

631

632 FIGURE. 3



633

634

635

636

637

638

639

640

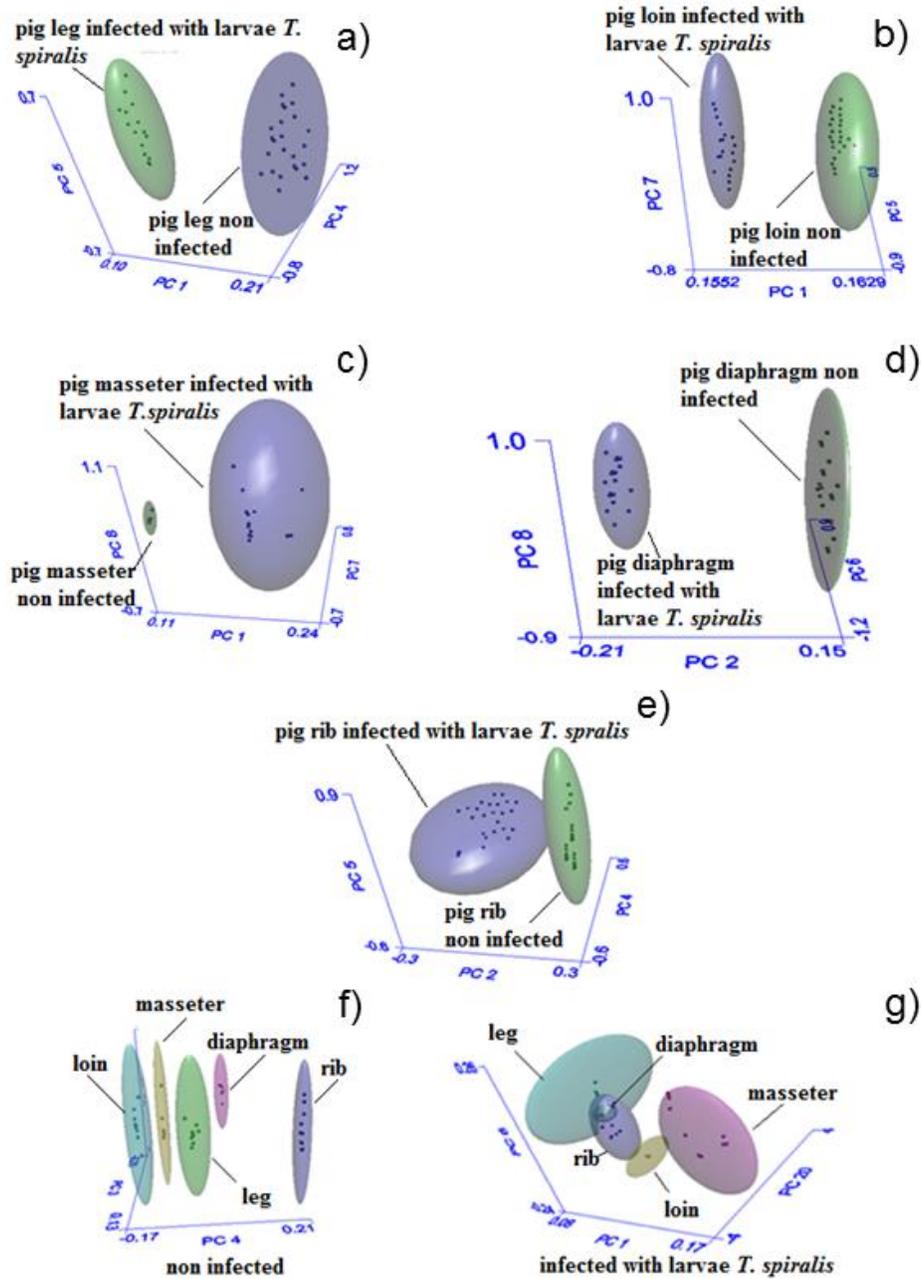
641

642

643

644

645 FIGURE. 4



646

647

648 Table 1. Western blot results from *T. spiralis* pig's infected samples.
649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

681

Days post infection	45KDa	49KDa	53KDa
0	-	-	-
20	+	+	+
40	+	+	+
80	+	+	+
120	+	+	+

682 Table 2. Number of larvae for different types of muscles evaluated by artificial digestion
683 (D) and trichinoscopy (T)

Muscle	pig 1	pig 2	pig 3	pig 4	pig 5
RIB T	40±19	40± 14	48±16	33±22	6±4
RIB D	57±25	61±17	45±18	19±15	10±8
LOIN T	42±24	36±15	27±10	20±10	10±7
LOIN D	66±28	44±26	33±18	25±16	13±11
LEG T	57±18	57±13	36±18	29±17	7±5
LEG D	81±20	67±22	32±22	30±14	10±9
DIAPHRAGM T	243±20	190±22	193±20	180±36	158± 23
DIAPHRAGM D	338±25	300±32	187±16	162±47	97±55
MASSETER T	137±46	107± 25	83±20	61±12	48±6
MASSETER D	178±32	175±30	120±11	100± 25	76±21

684

685

686

687

688

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

699

700

701 Table 3. Inter-class distance and percentages of recognition and rejection rates (SIMCA
702 model) between *T. spiralis* infected and non infected pigs muscles.

Class	ID ^a	Recognition rate (%)	Rejection rate (%)
Leg infected	23.3	100 (100/100)	100 (100/100)
Leg non infected			
Loin infected	22.6	100 (100/100)	100 (100/100)
Loin non infected			
Rib infected	13.5	100 (100/100)	100 (100/100)
Rib non infected			
Masseter infected	36.8	100(100/100)	100 (100/100)
Masseter non infected			
Diaphragm infected	30.5	100(100/100)	100 (100/100)
Diaphragm non infected			

a :ID: Interclass distance.

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

716

717

718

719

720 Table 4. Interclass distance for different types of pig muscles infected or non-infected with
721 *T. spiralis*.

	Leg	Rib	Masseter	Diaphragm	Loin
Non infected					
Leg		20.6	19.3	24.7	18.2
Rib			24.5	26.4	30.6
Masseter				21.4	17.6
Diaphragm					26.9
Infected					
	Leg	Rib	Masseter	Diaphragm	Loin
Leg		13.2	17.5	13.4	15.8
Rib			14.7	11.2	10.6
Masseter				15.4	9.9
Diaphragm					13.3

722

723

724

725

726

727

Table 5. The percentage of recognition and rejection rates for all samples (infected and non-infected)

Class	Recognition rate (%)	Rejection rate (%)
non infected		
Leg	100 (30/30)	100(120/120)
Rib	100 (30/30)	100(120/120)
Loin	100 (30/30)	100(120/120)
Masseter	100(30/30)	100(120/120)
Diaphragm	100 (30/30)	100(120/120)
Infected		
Leg	100 (30/30)	100(120/120)
Rib	100 (30/30)	100(120/120)
Loin	100 (30/30)	100(120/120)
Masseter	100 (30/30)	100(120/120)
Diaphragm	100 (30/30)	100(120/120)



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioquímica de los Alimentos, del Departamento de Investigación y Graduados en Alimentos, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Lidia Dorantes Álvarez y la Dra. Georgina Calderón Domínguez. Parte del desarrollo experimental se realizó en el laboratorio de Biofísica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas a cargo de la Dra. Tzayhri Gallardo Velázquez, al igual que en el laboratorio de Helminos Tisulares a cargo del M en C. Jorge Luis De la Rosa en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (InDRE)

Agradecemos a Irma Valle por el cuidado de las ratas experimentales en las instalaciones del InDRE, así como al Dr. Pablo Martínez Labat de la FES-Cuautitlán por su asesoría y colaboración, y a los pasantes de M.V.Z. Ana Berenice López Lugo y Pablo Sánchez Paredes por el mantenimiento y cuidado de los cerdos.

La realización de este trabajo fue posible gracias al financiamiento otorgado por los proyectos de SIP-IPN 20100575 y 20110813.

Mi Agradecimiento al consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudio otorgada (número de registro 21583) y al Instituto Politécnico Nacional por la beca del programa PIFI.

Durante estos años son muchas las personas e instituciones que han participado en este trabajo y a quienes quiero expresar mi gratitud por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada en el cual, directa o indirectamente, participaron opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

En primer lugar quiero agradecer a Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

Al Departamento del Alimentos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por su acogida y el apoyo recibido durante los cuatro años fructíferos en que he desarrolle en mi labor investigadora.

Agradezco a mi Directora de Tesis la Dra. Lidia Dorantes por haber confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección de este trabajo. A igual que a mi Co-Directora la Dra. Georgina Calderón por los consejos, el apoyo y el ánimo que me brindó.

Al Dr. Gustavo Gutiérrez por su apoyo y amistad en todo momento desde el ingreso hasta la culminación de esta tesis.

A la Dra. Tzahyri gracias por su amistad, por su gran apoyo, asesoría, cooperación y motivación para la culminación de mis estudios profesionales.

Al Dr. Guillermo Osorio el cual de manera incondicional me brindo su amistad, además de cooperar y trabajar de manera profesional en este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Biofísica los cuales me ayudaron y me cobijaron como uno más de ellos ayudándome y brindándome su amistad a todos y cada uno mil gracias.

Al Dr. Benjamín Nogueta por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la Tesis y sus atinadas correcciones.



También me complace agradecer la acogida, el apoyo y los medios recibidos en el InDRE centros donde he desarrollado parte de mi Doctorado.

Al maestro Jorge Luis de la Rosa por su cooperación y tiempo compartido impulsando siempre el desarrollo de mi formación profesional.

No puedo olvidar a mis compañeros y amigos del InDRE con los cuales he compartido incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme.

A mi madre Adela.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre Eusebio.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis familiares.

A mis hermanas Lizeth y Katherin por las cuales aprendí aciertos de momentos difíciles, además por su gran y apreciable amor y comprensión.

A mi abuelita Goyita parte medular en mi educación y crecimiento a la cual le agradeceré infinitamente donde quiera que estés te Amo.

A la Familia De Anda Sánchez por estar conmigo en cada momento de mi vida y crecimiento profesional.

Mis amigos.

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional: Janeth, Alejandro, Fredy, Alejandra, Karen, Felipe, Roció, David, Juan, Luz, José luís, Arturo, Juan Carlos, Mary, Arturo, Ivonne, gracias por haberme ayudado a realizar este trabajo.

A todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. **¡Gracias a ustedes!**

INDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TRIQUINELOSIS EN MÉXICO.	6
2.1 MORFOLOGÍA DE <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i>	6
2.3. CICLO BIOLÓGICO DE <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i>	9
2.4. DIAGNÓSTICO.....	14
2.5 CONTROL Y PREVENCIÓN	18
2.5.1 Organismos Reguladores	18
2.5.2. Buenas Prácticas Pecuarias.....	20
2.5.3. Inspección en mataderos.....	21
2.5.4. Normas de regulación.....	22
2.5.5. Prevención de la parasitosis.....	23
2.6 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO	24
2.6.1 Métodos de detección.....	25
2.6.2 Métodos Alternativos Espectroscopía.....	31
3. JUSTIFICACIÓN:.....	39
4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVOS.	41
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	41
5.2. OBJETIVOS PARTICULARES	41
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	42
6.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL EN EL MODELO MURINO	42
6.2 COMPARACIÓN DE PARÁSITOS POR FTIR-HATR.....	44
6.4. DESARROLLO EXPERIMENTAL DE CERDOS INFECTADOS	45
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
7.1 EXPERIMENTACIÓN DEL MODELO MURINO.	48
7.1.1 Modelo experimental.	48
7.1.2 Mantenimiento de cepa <i>Trichinella spiralis</i>	48
7.1.3. Obtención de larvas musculares.....	48
7.1.4. Obtención de la muestras.....	49
7.1.5. Determinación de <i>Trichinella spiralis</i> por triquinoscopía (Compresión).....	49
7.1.6. Digestión artificial.....	50
7.1.7. Preparación de muestras con larvas.....	50

7.1.8. Obtención de espectros FTIR-HATR de muestras de carne mezclada con larvas de <i>Trichinella spiralis</i> y carne sin infectar.	50
7.1.9. Desarrollo del modelo SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes).	51
7.2. EXPERIMENTACIÓN EN CERDOS INFECTADOS	51
7.2.1. Obtención de la muestras	51
7.2.2. Determinación de <i>Trichinella spiralis</i> por triquinoscopia (compresión)	52
7.2.3. Digestión artificial.....	52
7.2.4. Obtención antígeno para pruebas de Elisa y Western blot.....	52
7.2.5. Diálisis	53
7.2.6. Monitoreo post infección de <i>Trichinella spiralis</i> por métodos inmunológicos de Elisa y Western blot.....	53
7.2.7. Ensayo Inmunoenzimático para la detección de anticuerpos séricos (Elisa)	54
7.2.8. Western blot	54
7.2.9. Obtención de espectros FTIR-HATR de muestras de carne de cerdo infectado con <i>Trichinella spiralis</i> y carne de cerdo control.	56
7.2.10. Desarrollo del modelo SIMCA.....	56
8. RESULTADOS.....	57
8.1. DETERMINACIÓN DE <i>T. SPIRALIS</i> EN EL MODELO MURINO.	57
8.1.1. Caracterización espectral de la materia prima	57
8.1.2. Discriminación de espectros de carne de rata mezclada con larvas y carne control por SIMCA... ..	61
8.1.3. Discriminación de parásitos por SIMCA	63
8.2 .DETERMINACIÓN DE <i>T. SPIRALIS</i> EN CERDO INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE	65
8.2.1. Análisis de datos del estudio de cerdos infectados por los métodos de triquinoscopia y digestión artificial.....	68
8.2.2. Discriminación de espectros de diafragma, macetero, lomo, pierna y costilla de cerdo control.	70
8.2.3. Diferenciación de espectros IR de diafragma, macetero, lomo, pierna y costilla de cerdos infectados con larvas de <i>Trichinella spiralis</i> por el modelo SIMCA	71
8.2.4. Interpretación de los espectros FTIR/HATR de músculos de cerdo infectado y no infectado con <i>T. spiralis</i>	73
8.2.5. Discriminación de espectros de diafragma, macetero, lomo, pierna y costilla de cerdo infectado y no infectados con <i>Trichinella spiralis</i> por el modelo quimiométrico SIMCA.....	76
9. CONCLUSIONES.....	82
10. BIBLIOGRAFÍA	85
APÉNDICES I MATERIAL.....	96
APÉNDICE II – SOLUCIONES.....	98
APENDICE III.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estados de la República Mexicana con brotes de triquinelosis humana y animal reportados.	4
2	Enquistamiento muscular.	7
3	Larva enquistada corte medio transversal.	7
4	Morfología de larva infectante.	7
5	Morfología de Hembra.	8
6	Morfología del Macho.	9
7	Ciclo biológico de <i>Trichinella spiralis</i> .	11
8	Las fases de la ciclo de <i>T. spiralis</i> .	12
9	Diafragma de rata Long Evan infectada con <i>T. spiralis</i>	12
10	Célula nodriza, complejo parasitario	13
11	Modelos vibracionales del grupo H-C-H.	26
12	Espectro de infrarrojo medio.	26
13	Tipos de radiación y zonas del infrarrojo.	27
14	Diagrama del FTIR.	29
15	Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR)	30
16	Desarrollo del modelo SIMCA.	34
17	Diagrama del análisis multivariable cualitativo.	35
18	Desarrollo experimental propuesto para la determinación de <i>T. spiralis</i> en el modelo murino.	43
19	Desarrollo experimental propuesto para el estudio de parásitos	44
20	Desarrollo experimental estudios preliminares para la aplicación de FTIR-HATR-SIMCA a cerdos infectados.	45

21	Desarrollo experimental propuesto para cerdos infectados y no infectados con <i>T. spiralis</i> .	47
22	Espectros de larvas de <i>Trichinella spiralis</i> .	57
23	Espectros de carne infectada, no infectada mezclada y larva de <i>T. spiralis</i> .	58
24	Espectros de carne de rata mezclada con diferentes números de larvas.	59
25	Espectros de carne de rata a) Espectro completo b) Región de huella digital (muestras mezcladas con <i>T. spiralis</i> en color azul y mezclas control en color verde)	60
26	Modelo tridimensional SIMCA de carne de rata mezclada con <i>T. spiralis</i> y carne control. (Análisis de componentes).	61
27	Distribución espacial de las poblaciones de parásitos obtenidas con el modelo SIMCA optimado.	64
28	Valores de absorbancia obtenidos de las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos contra <i>Trichinella spiralis</i> .	66
29	Presencia de anticuerpos contra <i>Trichinella spiralis</i> después de la infección por la técnica de Western blot.	67
30	Número de larvas de diferentes tipos de músculos evaluados por digestión artificial (D) y triquinoscopia (T).	69
31	Distribución espacial de las poblaciones de músculos de cerdo control obtenidas con el modelo SIMCA optimizado.	70
32	Modelo tridimensional SIMCA de carne de cerdo infectado experimentalmente.	71
33	FTIR-HATR espectros de los diferentes músculos de cerdos infectados y no infectados con <i>T. spiralis</i> .	75
34	Análisis tridimensional de componentes principales de músculos de cerdo (costilla, pierna y lomo) infectado con <i>T. spiralis</i> y no infectado.	77
35	Análisis tridimensional de componentes principales de músculos de cerdo (diafragma y macetero) infectado con <i>T. spiralis</i> y no infectado.	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Características de especies y genotipos del género <i>Trichinella</i> .	5
2	Manifestaciones clínicas de la triquinelosis	15
3	Técnicas de diagnóstico para determinación de triquinelosis	16
4	Absorción de grupos funcionales del espectro de infrarrojo medio.	28
5	Distancia inter-clase de rata mezclada y no mezclada con <i>T. spiralis</i> .	62
6	Clasificación de resultados de carne mezclada y no mezclada con larvas de <i>T. spiralis</i> .	63
7	Distancia inter-clase de parásitos.	63
8	Resultados del SIMCA para la clasificación de parásitos	64
9	Distancia inter-clase de diferentes tipos de músculos de cerdo infectados y no infectados con <i>T. spiralis</i> .	72
10	Porcentaje de reconocimiento y de rechazo de las muestras (infectadas y no infectadas).	73
11	Distancia inter-clase y porcentaje de reconocimiento y de rechazo de las muestras infectadas y no infectadas con <i>T. spiralis</i> .	79

RESUMEN

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), con reflectancia total atenuada horizontal (HATR) y análisis independiente de clasificación análoga (SIMCA) se utilizó para evaluar la viabilidad de la detección de *Trichinella spiralis*, en muestras de carne. Inicialmente se trabajó con un sistema murino. El rango de FTIR seleccionado para este sistema fue de 1700-900 cm^{-1} . Los espectros fueron tratados con la primera derivada en el análisis SIMCA y los resultados mostraron una distancia inter-clase en el análisis de la carne de ratas infectadas y no infectadas de 14,6 con un 92% en la tasa de reconocimiento. Asimismo se determinó hasta un mínimo de tres larvas de *T. spiralis* en 10 g de carne de rata con un límite de confianza del 99%. Para evitar falsos positivos derivados de otros parásitos, se desarrolló otro modelo quimiométrico mediante el análisis de *Ascaris lumbricoides*, *Taenia solium* y *Trichinella spiralis*, lo que confirmó que este método puede distinguir correctamente estas clases de parásitos. Paralelamente se hicieron estudios preliminares para evaluar la posibilidad de su aplicación en cerdo para lo cual se utilizaron lenguas de rata y cerdo obteniendo como resultado una similitud de 99.8 entre ambas muestras. Para el caso de la detección de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo. Siete animales machos fueron utilizados en la investigación, 2 de referencia (no infectados) y cinco infectados por vía oral a concentraciones de larvas diferentes (13000, 6500, 3500, 1625, 812 larvas/cerdo). Después de 24 semanas, los animales fueron sacrificados. Se estudiaron cinco tipos de músculos (pierna, lomo, costilla, masetero, y el diafragma). Los resultados mostraron que MID-FTIR-HATR-SIMCA fue útil para determinar la presencia de *T. spiralis* en las muestras, con una distancia inter-clase entre los músculos infectadas y no infectadas que varió desde 13,5 hasta 36,8. Esta técnica también resultó útil para discriminar entre los músculos de cerdo, donde el músculo masetero mostró la mayor distancia entre las clases, mientras que en la costilla se observó el menor valor. En todos los casos las tasas de reconocimiento y rechazo fueron del 100%, lo que significa que la metodología es capaz de discriminar con precisión carne infectada con *T. spiralis* de la de cerdos no infectados.

ABSTRACT

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy with attenuated total reflectance (HATR) and soft independent class of analogies (SIMCA) was used to assess the feasibility of detecting *Trichinella spiralis*, in meat samples. Initially a murine system application was developed. The selected FTIR wave number range was 1700-900 cm⁻¹ and the first derivative of the spectra was subjected to SIMCA analysis. Results showed that the interclass distance when analyzing infected and non-infected rat meat was 14.6 with 92 % correct classification. No false positive results were obtained and a minimum of three larvae in 10 g of sample could be detected with a 99% confidence limit. To avoid false positives arising from other parasites, another chemometric model was developed by analyzing *Ascaris lumbricoides*, *Taenia solium* and *Trichinella spiralis*, which confirmed that this method could correctly distinguish these classes of parasites. Preliminary studies were conducted to evaluate the possibility of its application in pigs where rat and pig tongues were used resulting in a 99.8 similarity between the two samples. Detection of *Trichinella spiralis* in swine meat were carried out in. Seven male pigs where; 2 references (non-infected) and five male pigs were orally infected at different larvae concentrations (13000, 6500, 3500, 1625, 812 larvae/pig) and after 24 weeks the animals were euthanized. Five types of muscles were studied (leg, loin, rib, masseter, and diaphragm). Results showed that MID-FTIR-HATR-SIMCA was useful to determine the presence of *T. spiralis* in the samples, as the interclass distance between infected and non infected muscles varied from 13.5 to 36.8. This technique was also useful to discriminate among pig muscles, where masseter showed the largest interclass distance, while rib presented the smallest one. In all cases the recognition and rejection rates was 100%, which means that the methodology is capable of accurately separate *T. spiralis* infected from non infected swine meat.

1. INTRODUCCION

La carne es un alimento de muy corta vida de anaquel debido principalmente a su alto contenido de agua y a que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias y parásitos que en algunos casos pueden llegar a representar una amenaza para la salud del hombre. Por otro lado existen microorganismos que afectan a la salud de los animales y que son transmitidas al hombre. Las enfermedades que se presentan por esta vía se les conocen como zoonosis (Hui, 2000) y el impacto y la magnitud del problema que llegan a representar este tipo de enfermedades cuando son transmitidas por los alimentos sólo se ponen de manifiesto ante la aparición de brotes epidémicos (Calcagno *et al.*, 2005). En el área de cárnicos se ha visto un incremento en los brotes de estas zoonosis, sobre todo de origen parasitario, en particular las producidas por helmintos, específicamente por *Trichinella spiralis* (Pérez *et al.*, 2000) la cual produce, en los seres humanos, una infección llamada triquinelosis (Luna *et al.*, 2006).

La triquinelosis es una enfermedad zoonótica causada por diferentes especies, subespecies y cepas de nematodos del género *Trichinella* (Murrell, *et al* 2000; Despomier, 2004; Sánchez y Luna, 2006) que afecta a mamíferos domésticos y silvestres; en humanos, la infección más prevalente es causada por *T. spiralis* la cual tiene una amplia distribución en todo el mundo, constituyendo un problema de salud pública. Dicha parasitosis es habitual en países y regiones donde se consumen carne cruda o poco cocida de cerdo, o de algún otro animal parasitado (caballo, zorro), como ocurre en Europa y Estados Unidos de América; siendo menos detectada en África y Latinoamérica principalmente por falta de datos de epidemias en comunidades rurales, y casi inexistente en algunos países del Medio Oriente, Asia e Islas del Pacífico, lo cual está muy relacionado con prácticas religiosas que prohíben la ingestión de carne de cerdo (Moorhead *et al.*, 1999; Ortega-Pierres *et al.*, 2000).

En México se han reportado brotes en distintas urbes; a pesar de esto los únicos mataderos que controlan la presencia de *Trichinella* son los establecimientos tipo

inspección federal (TIF) los cuales se basan en la norma NOM-194-SSA1-2004 en la que se menciona como pruebas de determinación a la triquinoscopia y la digestión artificial (Medina *et al.*, 2009) las cuales son ensayos de larga duración y requieren de un laboratorio establecido en el sitio de control.

Una de las herramientas empleadas actualmente en el área de alimentos para la detección de componentes es la espectroscopia infrarroja y el análisis multivariable, esta tecnología ofrece una amplia gama de posibilidades para desarrollar modelos de predicción tanto cuantitativos como cualitativos de la composición de la muestra, a lo que se le nombra análisis quimiométrico (Meza *et al.* 2011)

Estudios recientes han mostrado la factibilidad de identificar con la espectroscopia infrarroja media por transformada de Fourier (MID-FTID) adulteraciones en alimentos tales como: adulteración y caracterización del aceite de oliva (Marcos *et al.*, 2002), clasificación de harinas, determinación de cafeína en bebidas carbonatadas (Paradkar e Irudayaraj ., 2002), determinación de colesterol en productos lácteos (Paradkar e Irudayaraj., 2002b), adulteración de productos de chocolate y pasteles (Che Man *et al.*, 2005).

En el área médica esta tecnología ofrece una amplia gama de aplicaciones como la determinación de diferentes bacterias, así como la detección de células cancerígenas en tejido cerebral (Mariela, 2005; Park *et al.*, 2007).

Considerando la utilidad y la potencialidad de la espectroscopia de infrarrojo y el análisis multivariable para determinar adulteraciones y la problemática en cuanto a la determinación analítica de *Trichinella spiralis* se desprende la posibilidad de utilizar estas metodologías para la detección de este parásito en carnes infectadas con *Trichinella spiralis* y así contribuir con una técnica más rápida y confiable para la detección del parásito a niveles nacional e internacional.

2. ANTECEDENTES

La triquinelosis es una infección causada por un áscaris (*Trichinella spiralis*) y constituye una enfermedad zoonótica cosmopolita, incluyendo las tierras templadas, árticas y zonas tropicales (Moorhead *et al.*, 1999; Woon *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2005). Es una zoonosis directa, transmitida de un hospedero vertebrado infectado a un hospedero vertebrado susceptible, por medio de un vehículo o vector mecánico. El agente no experimenta cambios propagativos ni de desarrollo en el proceso de transmisión; el desarrollo y multiplicación se realizan en el hospedero. Esta zoonosis se mantiene en la naturaleza principalmente en carnívoros (Makedonka y Douglas, 2006).

El consumo de carne de cerdo se ha considerado como la fuente más importante de transmisión de esta enfermedad en humanos, aunque últimamente los brotes más graves de triquinelosis en Europa han sido atribuidos al consumo de carne de caballo infectada, esto debido a la globalización, la escasez de alimentos y el bajo costo de esta carne (Berumen ,2002). Por otro lado, el flujo migratorio de las personas, sus hábitos alimenticios, la importación ilegal de carne no controlada desde países endémicos a no endémicos y los nuevos platillos donde se incluyen carnes crudas, son el resultado de brotes (Ortega-Pierres *et al.*, 2000). En México, las infecciones con *Trichinella* en humanos, cerdos, ratas, gatos y perros han sido reportadas en varios estados de la República Mexicana (Figura 1).



Figura 1. Estados de la República Mexicana con brotes de triquinelosis humana y animal reportados (Secretaria de Salud SSA, 2002).

Estados con alta prevalencia (■) Durango (1), Zacatecas (2), Estado de México (3), Ciudad de México (4); estados con mediana prevalencia (■): Chihuahua (5), Jalisco (6), Michoacán (7); estados con baja prevalencia (■): Aguascalientes (8), Sonora (9), Hidalgo (10), Querétaro (11), Guerrero (12), Guanajuato (13), Veracruz (14) y Nuevo León (15) (Ortega – Pierres *et al.*, 2000); estados con brotes de *T. spiralis* reportados en 2001 y 2002, a excepción de San Luis Potosí (en la cual se reportaron en 1998, la presencia de anticuerpos) (De la Rosa *et al.*, 1998) (■): Baja California Sur, Sinaloa, Tabasco y Chiapas (Secretaria de Salud SSA, 2002).

Con respecto a la taxonomía de *Trichinella*, el conocimiento ha aumentado considerablemente en los últimos 30 años y, hasta la fecha, ocho especies se han identificado (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. pseudospiralis*, *T. papuae* y *T. zimbabwensis*), y cuatro genotipos han sido identificados (T6, T8, T9 y T12) (Tabla 1). También se sabe que todas las especies de *Trichinella* son patógenas para los seres humanos, aunque se han observado diferencias entre las especies y genotipos, en términos de los signos, síntomas y el curso clínico de las infecciones en seres humanos (Kapel 2000; Stojcevic *et al.*, 2004).

La triquinelosis sigue siendo un problema de salud pública en el mundo (Pozio, 2002; Dupouy, 2000). En concreto, se ha estimado que 10 millones de personas en todo el mundo podrían estar infectadas (Dupouy, 2000), y en los últimos 10 años ha habido un aumento en la incidencia de la infección entre los cerdos domésticos y animales silvestres, por consiguiente un aumento entre los humanos (Murrell y Pozio, 2000).

Tabla 1. Características de especies y genotipos del género *Trichinella* (Pozio, 2001)

TABLA # 1: Características de Especies y Genotipos del Genero <i>Tribchinella</i> ^a			
Especie de <i>Trichinella</i>	Cápsula de Colágena	Huéspedes	Principal fuente de infección de los seres humanos
<i>Trichinella spiralis</i>	Capsulada	Mamíferos silvestres y domésticos	Carne de cerdo y caballo
<i>Trichinella nativa</i>	Capsulada	Carnívoros silvestres	Carne de morsa y oso
<i>Trichinella nelsoni</i>	Capsulada	Mamíferos silvestres	Jabalí y cerdo silvestre
<i>Trichinella britovi</i>	Capsulada	Mamíferos silvestres y rara vez en cerdo domestico	Carne de jabalí, cerdo, Caballo, zorros y chacales
<i>Trichinella murrelli</i>	Capsulada	Carnívoros silvestres	Carne de oso y caballo
<i>Trichinella pseudospiralis</i>	No capsulada	Mamíferos silvestres, Aves y cerdo doméstico	Carne de cerdo
<i>Trichinella papuae</i>	No capsulada	Cerdo silvestre y Cocodrilos de agua salada	Carne de cerdo
<i>Trichinella zimbabwensis</i>	No capsulada	Cocodrilos de granjas de África y Varanos	No documentado
Genotipo			
T6	Capsulada	Carnívoros silvestres	Carne de carnívoros silvestres
T8	Capsulada	Carnívoros silvestres	No documentado
T9	Capsulada		No documentado
T12	Capsulada	Pumas	No documentado

2.1. Epidemiología de la triquinelosis en México.

La triquinelosis fue descubierta en nuestro país por el Dr. Miguel Zúñiga en 1891, siendo el pionero de la parasitosis en México (Mazzotti y Chavira, 1943). En la época actual Vacio *et al.*, (2003) reportan que esta enfermedad tiene una frecuencia de hasta 8.1% de la población general mexicana provocada por el consumo de carne de cerdo mal cocida (Arriaga *et al.*, 1996). Por esta razón la triquinelosis es considerada un problema de salud tanto médico como veterinario, debido a su gran distribución a nivel nacional, la falta de técnicas sensibles para su diagnóstico, pero esencialmente por los brotes ocasionados a un porcentaje considerable de la población, en especial en comunidades rurales donde las condiciones en la crianza de los animales es insalubre y los casos de personas que padecen la enfermedad no se notifican ante la Secretaría de Salud (Vacio *et al.*, 2003).

2.1 Morfología de *Trichinella spiralis*.

La *Trichinella spiralis* es un nemátodo que presenta características morfológicas diferentes entre macho y hembra. El macho tiene una longitud de 1.4 a 1.6 mm, y un diámetro de 40 a 60 μm ; la hembra mide 2 mm de longitud por 150 μm de diámetro, en tanto que las larvas recién nacidas tienen un largo promedio de 111 μm , y un diámetro de 7 μm en su extremo anterior y se va afinando hasta las 3 μm en el extremo posterior (Martínez, 1998, Kapel, 2000).

Larva muscular

La larva en una etapa avanzada, tiene una longitud de .044 mm por 1 mm de diámetro (Figura 2 y 3), cuenta con un esticosoma formado por células que actúan como glándulas unicelulares, y consta de 3 tipos distintos de células las cuales son las subsidiarias de excreciones múltiples, en este periodo se distinguen los sexos (Gajadhar y Gamble, 2000).



Figura 2. Enquistamiento muscular (Gajadhar y Gamble, 2000)



Figura 3 Figura 2. Larva enquistada corte medio transversal (imagen propia)

✚ Larva muscular infectante (LI)

La larva infectante (LI) es una fase avanzada de larva de primer estado en la que se diferencian el esticosoma, que ocupa los dos tercios anteriores, el primordio genital y el intestino, que ocupan el tercio posterior (Figura 4). Ya en este estadio es posible diferenciar los sexos por la disposición que toman el primordio genital y el intestino: en los futuros machos se cruzan, en tanto que en las futuras hembras corren paralelos.

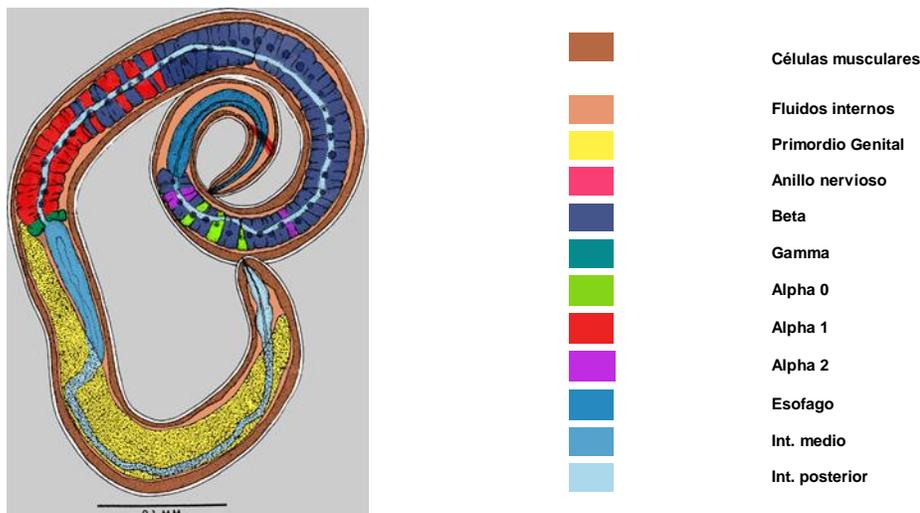


Figura 4. Morfología de larva infectante (Trichinella.org)

✚ Hembra

Las hembras son dos veces más grandes que los machos. La vulva está cerca del esófago, el cual es un tercio del largo del cuerpo de la parte anterior; su único útero contiene, en la parte anterior, larvas completamente desarrolladas y

juveniles en nacimiento, mientras que la parte posterior está llena de huevos que se están desarrollando (Figura 5) (Martínez, 1998).

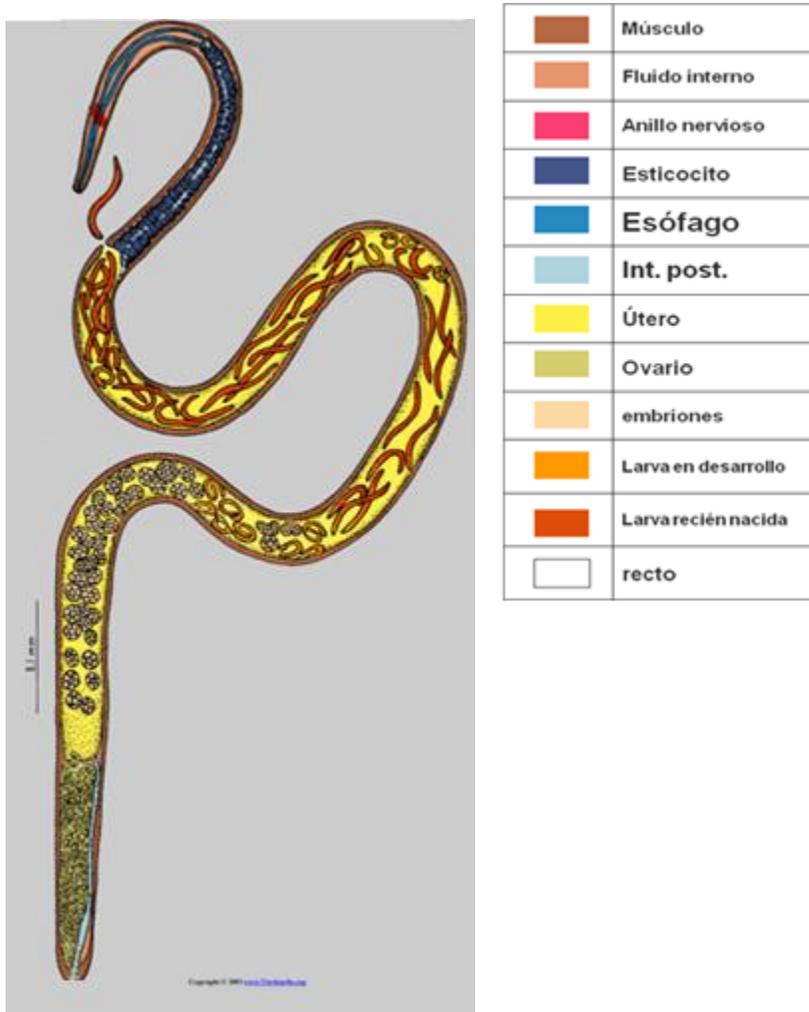
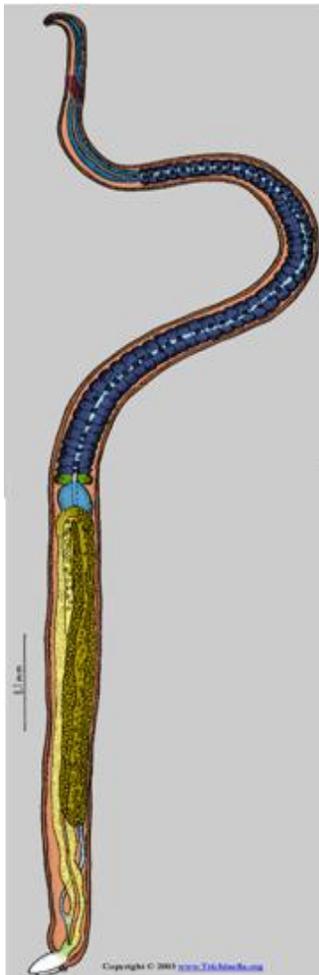


Figura 5. Morfología de Hembra (Trichinella.org)

Macho

El macho es más pequeño y posee un ano terminal el cual consta de una pseudobolsa copulatoria en cada lado del ano., careciendo así de espícula copulatoria. La protrusión del tubo copulatorio a través de la abertura cloacal, situada entre los apéndices copulatorios, forma la campana copulatoria. Los

apéndices mencionados actúan fijándose a la hembra durante la cópula. Entre los apéndices hay dos pares de papilas con función sensorial (Figura 6).



	Célula muscular
	Fluido interno
	Anillo nervioso
	Estílocito
	Esófago
	Intestino medio
	Int. posterior
	Célula glandular intestinal
	Testículos
	Vesícula intestinal
	Cloaca
	Papilas

Figura 6. Morfología del Macho (Trichinella.org)

2.3. Ciclo Biológico de *Trichinella spiralis*

Existen tres ciclos biológicos en donde está presente *T. spiralis*: el ciclo doméstico, el ciclo salvaje y el ciclo sinantrópico. El ciclo doméstico se relaciona fundamentalmente con las condiciones de los animales mamíferos criados para consumo humano, cuando éstos son manejados en malas condiciones higiénicas o simplemente cuando deben buscar su propia fuente de alimentación en sitios

inadecuados adquiriendo así la infección, principalmente por la ingestión de ratas infectadas (las ratas, debido a sus hábitos de canibalismo, mantienen y propagan la infección), cuando la fuente de alimentación se da en sitios eriazos o tiraderos. De igual forma, pueden infectarse con carnes de otros animales muertos que encuentran en los criaderos (Pozio 2000; Makedonka y Douglas, 2006).

La infección en el ciclo silvestre sucede entre carnívoros que se alimentan de presas vivas o de cadáveres de animales, cuyas carnes están infectadas con larvas de *Trichinella*. Los principales huéspedes domésticos de *T. spiralis* son las ratas, los cerdos. En este ciclo, el hombre aparece involucrado como un huésped accidental (Martínez, 1998; Ortega-Pierres *et al.*, 2000).

Entre los ciclos doméstico y salvaje, se encuentra el ciclo sinantrópico, en el que intervienen animales como gatos, perros, zorros, etc., que actúan como vehículo de los distintos genotipos de *Trichinella* involucrados en cualquiera de los ciclos mencionados (Martínez, 1998).

Ingestión y desarrollo del parásito en el humano

Investigaciones realizadas por Bruschi y Murrell, (2002) señalan que el inicio de la infección en el ser humano se da una vez consumido el alimento infectado con larvas, siendo éstas liberadas en el estómago por acción de las enzimas digestivas y son transportadas pasivamente por los movimientos peristálticos a las dos terceras partes del intestino delgado alcanzando la madurez entre los 2 y 6 días; posteriormente se lleva a cabo la cópula (Figura 7) (Cox, 2002). Los machos adultos copulan aproximadamente a las 48 h y se lleva a cabo en la mucosa del duodeno-yeyuno, mueren y son expulsados del intestino con la materia fecal. Las hembras se apropian en el nicho intestinal pasando el citoplasma de las células del epitelio y poniendo alrededor de 1300 larvas totales (Figura 8A) (Cox, 2002).

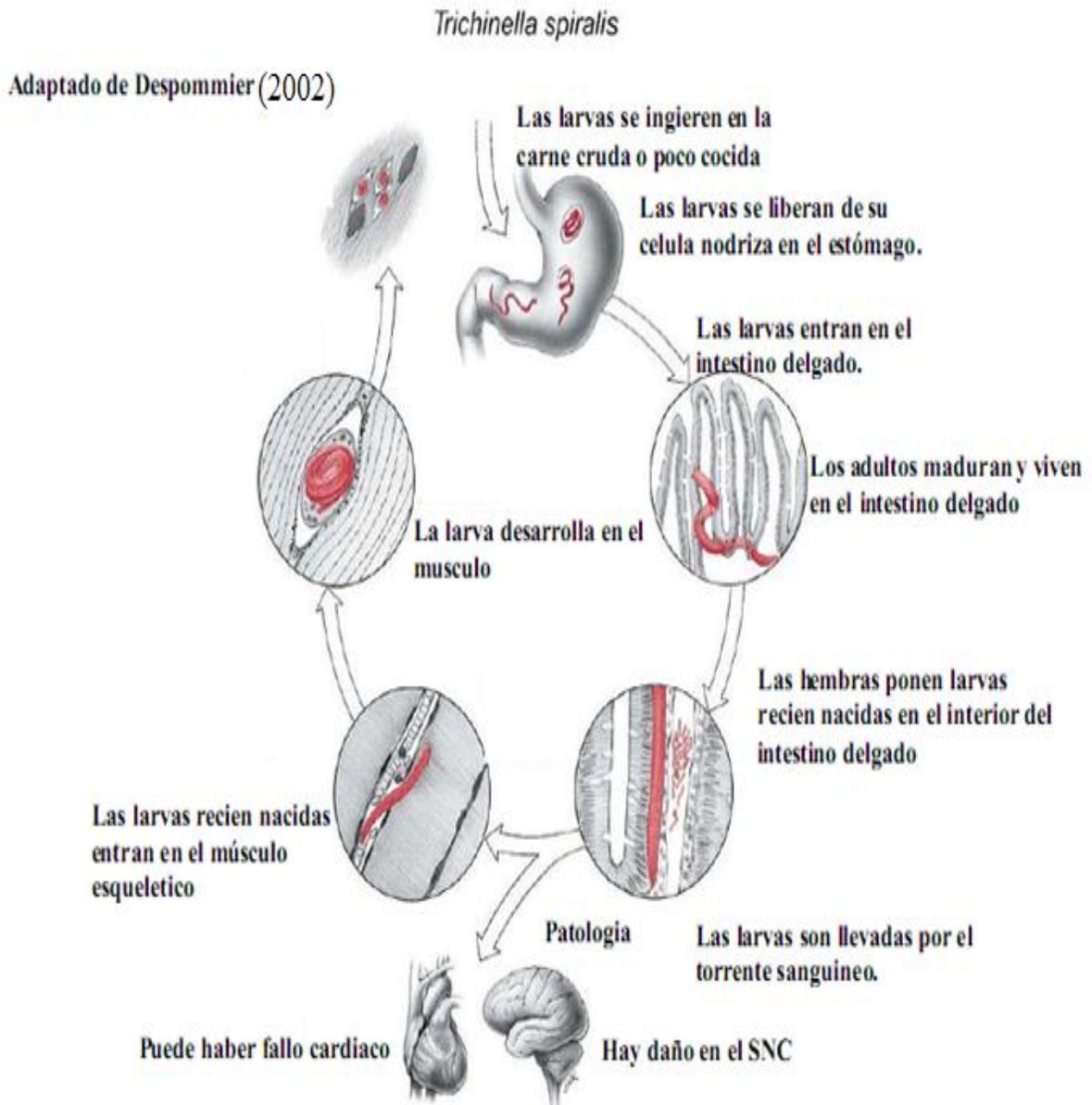


Figura 7. Ciclo biológico de *Trichinella spiralis* (Despommier 2002)

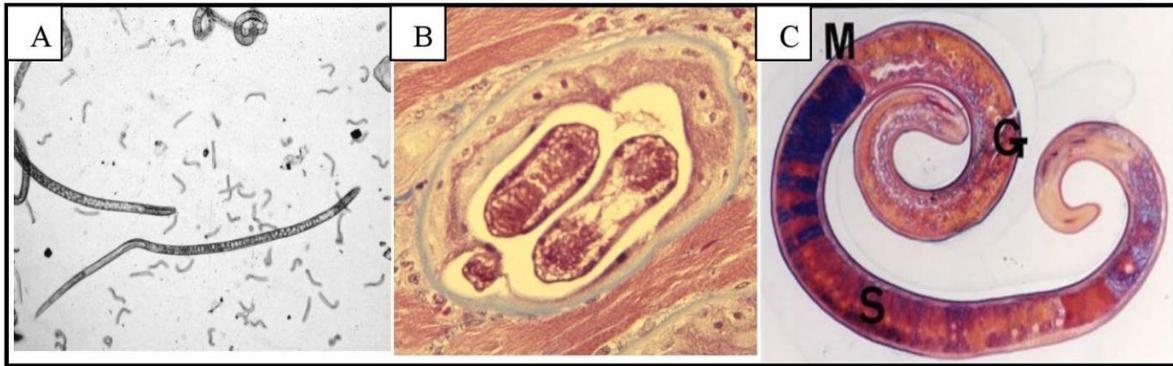


Figura 8. Las fases de la ciclo de *T. spiralis* A. Gusanos adultos desarrollados en el intestino delgado post-infección y larvas recién nacidas (L1 inmaduro). B. Músculo infectado de *T. spiralis* rodeado por su cápsula de colágeno (azul) C larva infectante en donde se muestra M, intestino medio .G, genital primordial S, stichocysto (Makedonka y Douglas,2006)

Las larvas con capacidad infectante (8C) se enquistan en los músculos mejor irrigados (figura 8B), como por ejemplo el diafragma (Figura 9), los maseteros, los músculos de la base de la lengua, los intercostales, los bíceps o los tríceps (Bruschi y Murrell, 2002). A diferencia de la mayoría de los parásitos intracelulares por ejemplo, *Leishmania braziliensis* o *Toxoplasma gondi*, las larvas de *T. spiralis* no matan a la célula hospedante, sino que inducen importantes modificaciones para producir una unidad anatómicamente independiente y muy especializada llamada célula nodriza.



Figura 9. Diafragma de rata Long Evan infectada con *T. spiralis*. El puntillito blanco que se observa corresponde a LI (larvas infectantes) de *Trichinella spiralis*. (Sánchez y Luna 2006).

Establecimiento muscular

La transformación de la célula muscular en una célula nodriza (Figura 10) implica el reemplazo de todos los componentes musculares específicos, filamentos de actina y miosina por espirales de membrana lisa y el agregado de mitocondrias parcialmente disfuncionales, el alargamiento del núcleo y desarrollo del nucléolo, la hipertrofia del glicocálix que es una cubierta de mucopolisacáridos que protege la membrana celular propiamente dicha, y la formación de una nueva red. Las larvas recién nacidas atraviesan la lámina propia de las vellosidades intestinales, penetran los capilares y/o los vasos linfáticos, y circulan en la sangre por la vena porta hepática o la vía linfática por el canal torácico hasta ubicarse en un músculo de mayor irrigación en el cuerpo como son los brazos, las piernas, el diafragma lengua, masetero y corazón (Pozio, 2001). Esta transformación de la célula huésped, inducida por la larva de *Trichinella spiralis* mediante la secreción y excreción de las sustancias producidas por las células componentes de su esticosoma, es la razón por la que este parásito es considerado como uno de los más exitosos simbiosomas intracelulares que se conocen.

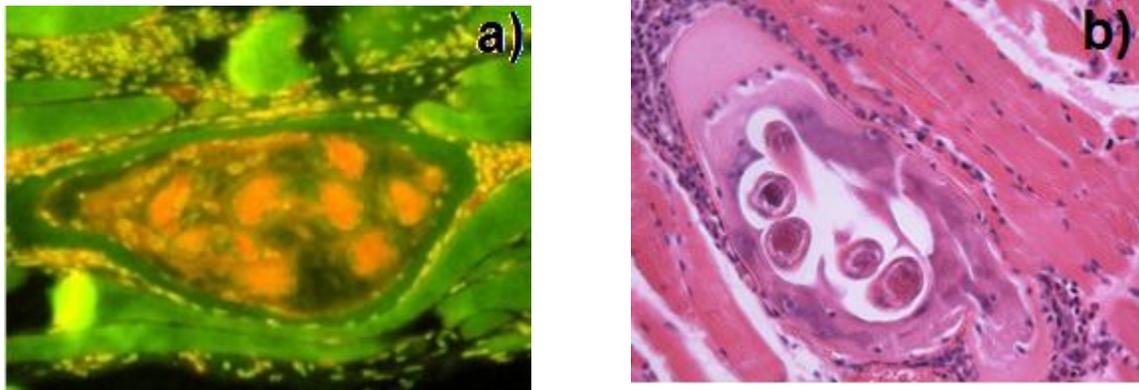


Figura 10. Célula nodriza. a) complejo parasitario obtenida por el método Acridina naranja b) Célula nodriza imagen propia 40 x (Despomier, 2004).

Posteriormente las larvas son distribuidas por los capilares y llegan a los músculos para su localización definitiva; algunas no inician el enquistamiento y vuelven a circular nuevamente en los vasos linfáticos y la sangre venosa. En este proceso,

que dura alrededor de 24 h, algunas larvas quedan retenidas en el hígado, pulmones, cerebro, corazón y morirán sin enquistarse (Pozio *et al.*, 1998). La larva que penetra en un tejido distinto al músculo estriado, no puede inducir la formación de su célula nodriza y no continúa su desarrollo. El proceso se completa en aproximadamente 20-28 días; las larvas viven enrolladas en el interior del quiste, realizando movimientos lentos de atrás hacia delante en la región central del citoplasma (Takahashi, 1990).

Las larvas enquistadas son infectantes durante varios años, dependiendo de la especie animal afectada; por ejemplo, en el cerdo lo son durante toda la vida del animal ya que experimentalmente se demostró que sobrevivían hasta cuatro años. Las larvas pueden inclusive sobrevivir aproximadamente cuatro meses en carne cruda de cerdo en proceso de putrefacción. Esto tiene singular importancia debido a que en nuestro país el origen de los casos de triquinosis humana está siempre asociado con la ingesta de carne de cerdo o caballo mal cocida o cruda (Pozio *et al.*, 1998).

2.4. Diagnóstico

Existe una dificultad para el diagnóstico debido a que el cuadro clínico suele ser muy común al de otras enfermedades (infecciosas y no infecciosas), como la fiebre tifoidea, influenza, síndrome de fatiga crónica, infección con VIH, poliarteritis nodosa y leucemia eosinofílica. Por estas causas el diagnóstico de la triquinosis debe basarse en tres criterios principales, propuestos por el Centro Europeo de Control de Enfermedades (Tabla 2) (Kociecka, 2001): (i) los hallazgos clínicos (reconocimiento de los signos y síntomas de la triquinosis), (ii) los hallazgos de laboratorio (larvas en tejido muscular, anticuerpos específicos) y por último (iii) la investigación epidemiológica (identificación de la fuente y origen de la infección).

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de la triquinosis (adaptado de Kociecka, 2001).

Criterio	Requisitos y clasificación del casos
Clínico	Al menos 3 de los 6 siguientes: fiebre, dolor e inflamación muscular, síntomas gastrointestinales, edema facial, eosinofilia y hemorragias subconjuntivales, subungueal, o de retina.
Laboratorio	Al menos 1 de las siguientes pruebas de laboratorio: La demostración de larvas de <i>Trichinella</i> en tejido muscular mediante biopsia, detección de anticuerpos específicos contra <i>Trichinella</i> , mediante inmunofluorescencia indirecta, ELISA o Western blot.
Epidemiológico	Al menos uno de los tres siguientes: Consumo de carne infectada con LM, (confirmado por laboratorio), consumo de productos derivados de un animal potencialmente infectado (confirmado por laboratorio), enlace con un caso humano (confirmado por laboratorio) con exposición a una fuente en común.

Para apoyar el diagnóstico clínico de esta parasitosis, se han empleado métodos directos e indirectos (Tabla 3). Los métodos directos se basan en técnicas parasitológicas (triquinoscopía, digestión enzimática artificial, observación microscópica de biopsias musculares), mientras que los indirectos (Nöckler *et al.*, 2009).en técnicas de biología molecular evidenciando la presencia del parásito a través de la respuesta humoral o celular del hospedador (ensayo inmunoenzimático (ELISA), la inmunoelectrotransferencia (IET), la inmunofluorescencia indirecta (IFI))

Tabla 3. Técnicas de diagnóstico para determinación de triquinelosis (Andiva et al., 2002)

TABLA 3: Técnicas de diagnóstico para diagnosticar Triquinelosis	
Directos	Indirectos
Triquinoscopía	Pruebas intradérmicas
Digestión enzimática	Fijación de complemento
Observación microscópica biopsia muscular	Hemaglutinación indirecta
	Floculación de bentonita
	Inmunofluorescencia indirecta
	Contrainmunolectroforesis
	Aglutinación en látex
	DIG-ELISA
	ELISA
	IET
	Biología Molecular
	<ul style="list-style-type: none"> • PCR • PCR – tiempo real (Q-PCR) • PCR multiplex

La larva muscular (LM) puede detectarse fácilmente cuando se hace una triquinoscopía o una biopsia muscular, a través de microscopía óptica, donde se puede apreciar completamente a la LM dentro del tejido muscular. Sin embargo la triquinoscopía falla cuando la carga parasitaria es baja, arrojando resultados falsos – negativos (Andiva *et al.*, 2002). Es por ello que se han diseñado técnicas enfocadas a la reacción antígeno – anticuerpo, por esta razón existe una amplia variedad de kits disponibles en el mercado, pero solo deben utilizarse aquellos que no producen resultados falsos – positivos por reacción cruzada con otros antígenos parasitarios (por ejemplo: larva migrans visceral y *Loa loa*) (Andiva *et al.*, 2002).

La técnica de ELISA es una de las más utilizadas para diagnosticar triquinelosis, ya que esta puede detectar anticuerpos específicos desde la segunda semana de la enfermedad, que corresponde a la tercera o cuarta semana de infección (Alcántara *et al.*, 1989; Nöckler *et al.*, 2009). ELISA brinda la posibilidad de analizar un gran número de muestras con rapidez *antemortem* y detectar infecciones bajas del orden 0.01 lpg (Marti *et al.*, 1987). Sin embargo, la desventaja reside en la imposibilidad de discriminar entre una exposición actual o pasada ya que animales inmunológicamente positivos, generadores de una alta respuesta inmune, pueden terminar la infección expulsando los adultos del intestino evitando así el asentamiento de la LM (Van Knapen *et al.*, 1980; Gottstein *et al.*, 2009). Aunque el empleo de extractos crudos le dan a esta técnica una alta sensibilidad, existe la posibilidad de que haya algunas reacciones cruzadas con otros parásitos. Estas reacciones disminuyen cuando se emplean antígenos de excreción – secreción de la LM (Arriaga *et al.*, 1989).

Los métodos directos e indirectos nombrados sirven para identificar infecciones con *Trichinella* spp. a nivel género, pero para identificar especies o genotipos se utiliza la técnica de PCR o sus variantes PCR – tiempo real y PCR multiplex, que detecta el ADN del parásito con una sensibilidad de 0.001 lpg. La identificación de diferentes genotipos permite hacer la distinción entre el ciclo de vida selvático y sinantrópico. La limitante de éstas técnicas es el alto costo del equipamiento y de los reactivos. La causa de falsos positivos se relaciona con las condiciones de asepsia necesarias para evitar la contaminación con ADN no específico. La detección de DNA de larvas migratorias puede identificarse a los 3 días post-infección en ratones infectados con 300 LM de *Trichinella spiralis*, demostrando la posibilidad realizar un diagnóstico temprano con esta técnica (Caballero y Jiménez, 2001).

Factores como especificidad, comodidad, sencillez, disponibilidad comercial y costo debe de tomarse en cuenta al elegir la técnica a utilizar.

2.5 Control y Prevención

2.5.1 Organismos Reguladores

La comercialización de carne de cerdo esta regulada por la Organización Mundial de Comercio (WTO) por sus siglas en ingles El objetivo principal de su creación es el apoyar el comercio internacional en todas sus facetas así como facilitar el flujo comercial entre todos los países miembros.

En la cuestión normativa esta organización esta encargada de vigilar que los productos utilizados para consumo humano sean producidos de acuerdo de acuerdo a las políticas de inocuidad alimentaria recomendada por el Codex Alimentarius, el cual es utilizado como referencia a nivel internacional.

Las guías y recomendaciones desarrolladas por la Comisión del Codex Alimentarius dependiente de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) marcan las reglas básicas para establecer las políticas de inocuidad alimentaria y los estándares de salud para los alimentos de origen animal y vegetal.

Codex Alimentarius

Es una comisión que se enfoca en el desarrollo de lineamientos, guías y propuestas de estándares en materia alimentarias a escala internacional.

En la actualidad las tareas del Codex se desarrollan sobre las base de comités de trabajo específicos.

Comisión de la Unión Europea (UE)

Esta comisión es la encargada del establecimiento y diseño de la normatividad para la inocuidad alimentaria, salud y bienestar de los animales ,dicha legislación aplica a los países que exportan animales o sus productos a la UE, con este fin se ha elaborado el libro blanco sobre la Seguridad Alimentaria (Comisión de la Unión Europea 2000) en donde se establecen los pasos a seguir para establecer sistemas alimentarios seguros basados en el los principio de Análisis de Peligros y

Puntos de Control Crítico (HACCP) con la finalidad de garantizar un elevado nivel de salud y protección de sus consumidores (SENASICA, 2011).

Comisiones Norteamericanas (USDA/FDA)

En los Estados Unidos de América las agencias encargadas de normar, promover y proteger la salud de los ciudadanos con especial atención al tema de inocuidad alimentaria, son la agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Estas agencias buscan que los productos de origen animal en este caso, lleguen al mercado de manera segura antes de ser consumidos, esto a través de leyes que aseguran que todos los ingredientes utilizados en los alimentos no sean un peligro potencial para consumo humano.

Secretaría de Salud

En México, la Secretaría de Salud es la encargada de proteger a la salud humana. La Ley General de Salud humana establece los reglamentos con las especificaciones sanitarias en el ámbito de salud, así como la producción de alimentos seguros y control de los desechos producidos durante el proceso de producción.

Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)

El Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) como organismo administrativo descentralizado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa), tiene injerencia en materia de inocuidad de los alimentos, compitiéndole como interés social el normar y vigilar que los animales, vegetales, productos y subproductos que se importan, movilizan o exportan del territorio nacional no pongan en riesgo la salud pública (SENASICA, 2011).

2.5.2. Buenas Prácticas Pecuarias.

Para garantizar la demanda de los mercados internacionales de consumir alimentos cárnicos inocuos es imprescindible establecer políticas y acciones que promuevan y garanticen la calidad higiénica para beneficio de los consumidores por medio de la adopción de sistemas de calidad y buenas prácticas de producción pecuaria.

Los factores relacionados en los criterios de producción son:

- ✚ Sanidad de los animales
- ✚ Seguridad alimentaria
- ✚ Criterios medioambientales
- ✚ Normas de bienestar animal

Se conoce como buenas practicas pecuarias al conjunto de procedimientos, condiciones y controles que se aplican en unidades de producción los cuales incluyen la limpieza de instalaciones físicas, equipo y utensilios, higiene y salud del personal para minimizar el riesgo de contaminación física, química y biológica durante la cría manejo y salud de la manada de cerdos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2000).

✚ Buenas prácticas de alimentación durante la producción porcina

El principal objetivo al producir cerdos es obtener mayor ganancia de peso en los animales con un menor consumo de alimento y tiempo de engorda posibles, estas practicas son esenciales para una buena salud del ganado porcino, en la ración diaria será necesario proveer de una cantidad y calidad adecuada de nutrientes balanceados para el estado productivo del animal, satisfaciendo sus requerimientos de energía, proteína, minerales vitaminas y agua, teniendo en consideración utilizar únicamente productos autorizados por Sagarpa (SENASICA, 2011).

✚ Buenas prácticas de sanidad durante la producción pecuaria.

La salud porcina se considera como una practica indispensable para mejorar las condiciones de crianza y bienestar de la porcicultura, ya que mediante las

actividades de prevención control y erradicación de las enfermedades que los afectan, los sistemas productivos son más eficientes y proporcionan una garantía sanitaria e inocuidad de los productos y subproductos derivados de estos.

Buenas prácticas de manejo durante la producción pecuaria

La prevención de entrada y salida de agentes infecciosos es un desafío continuo en las granjas, y cuando éstas son afectadas por una enfermedad el impacto en la salud y financiero es devastador, por tal motivo es importante contar con programas de bioseguridad los cuales ayudarán a disminuir los riesgos de transferir patógenos de una granja a otra (FAO, 2000).

Es muy importante considerar hoy en día en las granjas de producción porcina la elaboración de un programa de análisis de puntos de peligro críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés), para lo cual es necesario conocer los principios generales y códigos de prácticas del Codex de Higiene de los Alimentos.

El sistema HACCP deberá ser aplicado para cada una de las operaciones que se realicen en la granja, y en su caso actualizarlo después de cualquier modificación en alguno de los puntos del proceso de producción teniendo en cuenta que los sistemas HACCP deben ser sencillos y fáciles de aplicar (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2000; SENASICA, 2011).

2.5.3. Inspección en mataderos

En nuestro país, los únicos mataderos que determinan la presencia de *Trichinella spiralis* basándose en la Norma **NOM-194-SSA1-2004** (pruebas de Triquinoscopia y Digestión Artificial) son los establecimientos Tipo Inspección Federal (TIF), los cuales exportan carne de cerdo y caballo a países como Italia, Francia y Japón (Ancelle, 1998, Medina *et al.*, 2009). De igual forma se sacrifican cerdos y caballos en mataderos privados estatales donde la carne es destinada tanto para consumo humano como animal, en cuyo caso las exigencias de higiene

son menores; por lo tanto los productos cárnicos derivados de estos mataderos son la posible fuente de contaminación (Arriaga *et al.*, 1996).

Los principales métodos de análisis que se practican para el diagnóstico de *Trichinella spiralis* en animales por técnicas de laboratorio son:

1. Triquinoscopía: Este es un análisis de muestras extraídas preferentemente de los pilares del diafragma del animal, aunque también se han utilizado muestras de otros órganos como son: la lengua, músculos maseteros y abdominales (Gamble *et al.*, 1997).

2. Digestión artificial: este se realiza con el tejido muscular sometido a hidrólisis con pepsina y ácido clorhídrico *in vitro* (Doxey, 1987).

También existen actualmente técnicas de inmunoensayo para su determinación en humanos como son las pruebas de Elisa, Western blot y PCR que no son aplicadas en el área de cárnicos como control de calidad (Viveros *et al.*, 2001, Rodríguez *et al.*, 2004).

La Inmuno electro transferencia o Wester blot presenta una mayor especificidad con respecto a ELISA; ya que los sueros de pacientes con triquinelosis reconocen un patrón antigénico característico cuando se confrontan con los productos de excreción y secreción de la LM. La utilización de este inmunoensayo para determinar la presencia de anticuerpos contra *Trichinella spiralis*, se convierte en un indicador de gran valor para identificar la enfermedad en grupos de riesgo, considerando que el suero de pacientes con triquinelosis y el de animales infectados reconoce un triplete de antígenos (45, 49 y 55 kDa) que se considera de valor diagnóstico (Tinoco *et al.*, 2002), cuya presencia o ausencia es utilizada muchas veces en la confirmación de los resultados obtenidos por ELISA.

2.5.4. Normas de regulación

Organismos internacionales, como la Organización Internacional de Epizootias (OIE), se han encargado de normar como enfermedad de declaración obligatoria a la triquinelosis por ser una enfermedad transmisible importante; en el mismo

sentido, el Código Sanitario para los Animales Terrestres menciona en el artículo 2.2.9.5. las medidas y especificaciones, tanto para importadores como exportadores de carne de cerdo y caballo, que deben seguir para su comercialización como son:

- ✚ Exigir un certificado veterinario internacional.
- ✚ Que los animales sacrificados procedan de un matadero autorizado.
- ✚ Que se tengan resultados negativos a un procedimiento de diagnóstico de la triquinelosis o que se especifique que la carne fue tratada para la destrucción de las larvas (Organización Internacional de Epizootias 2007).

En Nuestro país dicha, condición está regulada por la Norma Oficial Mexicana **(NOM-194-SSA1-2004)**; esta Norma establece las especificaciones sanitarias que deben cumplir los establecimientos que se dedican al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio de sus productos. No obstante, existen mataderos estatales donde la carne que es destinada tanto para consumo humano como animal no se sujeta a esta normatividad, ocasionando con ello nulo control sanitario. En el caso de las exportaciones de carne de cerdo o de caballo éstas son reguladas por las normas de la Comunidad Europea a través de la Regulación **EC No 2075/2005**.

2.5.5. Prevención de la parasitosis

El control y prevención de la triquinelosis humana se basa en tres enfoques principales: (i) la educación del consumidor sobre el riesgo del consumo de carne cruda o semicruda de productos cárnicos de animales domésticos (por ejemplo, caballos y cerdos) y silvestres (jabalíes, osos, armadillos etc.) que pueden ser portadores de *Trichinella* y carecen de una inspección zoonosanitaria para su consumo (ii) la crianza de cerdos (la fuente más importante de infección de *Trichinella* para los seres humanos) y (iii) tener un control de todos los animales susceptibles (tanto domésticos como silvestres) por el método normalizados en sacrificio y después de la caza (Gottstein *et al.*, 2009). Para el caso de los mataderos, éstos deben ser modernos, con un equipamiento industrializado el cual

cuenta con un estricto control veterinario, así como también estar certificados por instancias competentes tanto nacionales como internacionales.

Toda la carne de animales que pueden contener larvas de *Trichinella* pero no pueden probarse por métodos de laboratorio adecuados, deben de ser tratadas por un procedimiento que se ha demostrado que inactiva *Trichinella* antes de su distribución para el consumo humano (Gamble *et al.*, 2000; Gajadhar *et al.*, 2009). Esto se aplica tanto para carne comercial y no comercial. Tres métodos han demostrado ser fiables en dicha inactivación: (i) un calentamiento hasta alcanzar una temperatura interna de al menos 71 ° C por lo menos 5 minutos (la carne debe de cambiar de color rosa a gris, y las fibras musculares se separan fácilmente unas de otras), (ii) la congelación (no muy recomendable por resistencia de algunas especies de *Trichinella*) y (iii) la irradiación.

2.6 Espectroscopía de Infrarrojo

Actualmente, existen herramientas en el área de alimentos y medicina como es la espectroscopía de infrarrojo media por transformada de Fourier (FTIR), la cual ha demostrado ser una opción atractiva para el análisis cualitativo y cuantitativo de los alimentos (Hernández *et al.*, 2010). En particular, la región media del infrarrojo (4000-550 cm⁻¹) provee información de la estructura química de los constituyentes de la muestra a través de las bandas de absorción del espectro.

Esta tecnología, ofrece una amplia gama de posibilidades para desarrollar modelos predictivos, tanto cuantitativa como cualitativamente, donde la composición de las muestras se pueden obtener por medio de análisis quimiométricos.

MID-FTIR ha conducido a grandes mejoras mediante la simplificación de manipulación de la muestra (Armenta *et al.*, 2005). MID-FTIR espectroscopía, junto a SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes, por sus siglas en inglés) se ha aplicado con éxito para el control de calidad de los

alimentos (Hernández *et al.*, 2010), y la detección de adulterantes (Meza *et al.*, 2010).

2.6.1 Métodos de detección

La espectroscopía de infrarrojo se basa en la interacción entre la radiación electromagnética emitida por una fuente de rayo infrarrojo y las moléculas que conforman el material de estudio. Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje y por tanto de la energía de la radiación utilizada (caracterizada por su longitud o número de onda), esta interacción será de diferente naturaleza: excitación de electrones, vibraciones moleculares y rotaciones moleculares (Osborne y Hindle, 1993) promoviendo cambios en las frecuencias de vibración de los enlaces entre los átomos y generando un espectro de absorción característico para una molécula dada, como si fuera una huella digital que revela información detallada acerca de la estructura y composición de la muestra (Arvanitoyannis *et al.*, 2005). Por consiguiente, la absorción o la falta de absorción en la región infrarroja se puede usar para identificar los tipos de grupos funcionales presentes en una molécula (Fox y Whitesell, 2000).

Las vibraciones de las moléculas y los átomos se dan a frecuencias específicas, conocidas como estados o formas de vibración, dentro de una banda de absorción o región espectral y están determinadas principalmente por la masa de los átomos y por la fuerza del enlace. Los modos vibracionales de las moléculas se pueden clasificar en movimientos de estiramiento simétrico, asimétrico, alabeo o flexión fuera del plano, mecimiento o flexión simétrica en el plano, torsión y cizalleo, los cuales están representados esquemáticamente en la Figura 11. Sólo las vibraciones que producen cambios en los momentos dipolares son activas en el infrarrojo, que son todas las indicadas en esta figura, a excepción del estiramiento simétrico, en la que los átomos de hidrógeno se mueven la misma distancia del átomo de carbono, por lo que no existe cambio en el momento dipolar (Willard *et al.*, 1991).

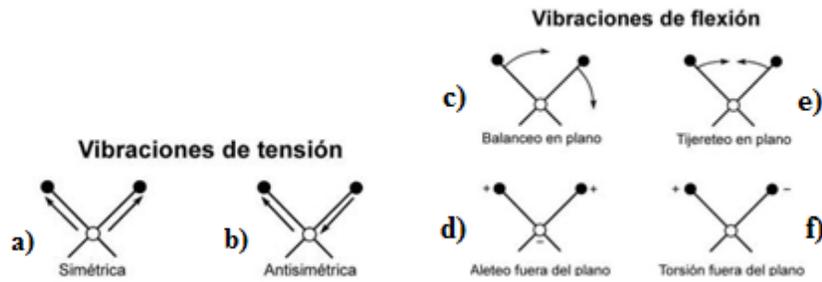


Figura 11. Modelos vibracionales del grupo H-C-H: (a) estiramiento simétrico; (b) estiramiento asimétrico; (c) alabeo o flexión fuera del plano; (d) mecimiento o flexión simétrica en el plano; (e) torsión (Fox y Whitesell, 2000).

🌈 Regiones Espectrales

La región del infrarrojo se extiende desde el extremo del rojo del espectro visible hasta la región de las microondas. Esta región incluye radiación de longitudes de onda comprendidas entre 0.7 y 500 micras o en número de onda entre 14, 000 a 200 cm^{-1} (Figura 13). La espectroscopía infrarroja involucra el examen de modos vibracionales y rotacionales de torsión y flexión de los átomos en una molécula en interacción con la radiación infrarroja. Parte de la radiación incidente es absorbida a longitudes de onda específicas, generando una multiplicidad de vibraciones, que ocurren simultáneamente y producen un espectro de absorción muy complejo que es característico solamente de los grupos funcionales que están presentes y de la configuración global de la molécula y que se manifiestan durante el análisis como picos de absorción (Figura 11-12) (Willard y col., 1991).

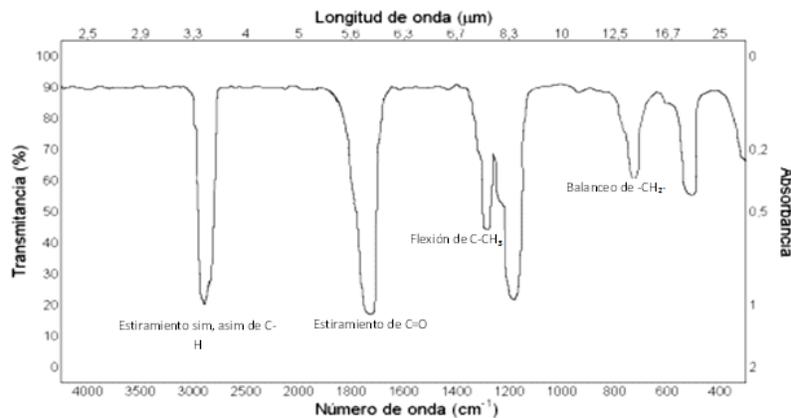


Figura 12. Espectro de infrarrojo medio

Los enlaces químicos en la espectroscopía infrarroja tienen 18 frecuencias específicas a las cuales vibran de manera correspondiente con su nivel de energía.

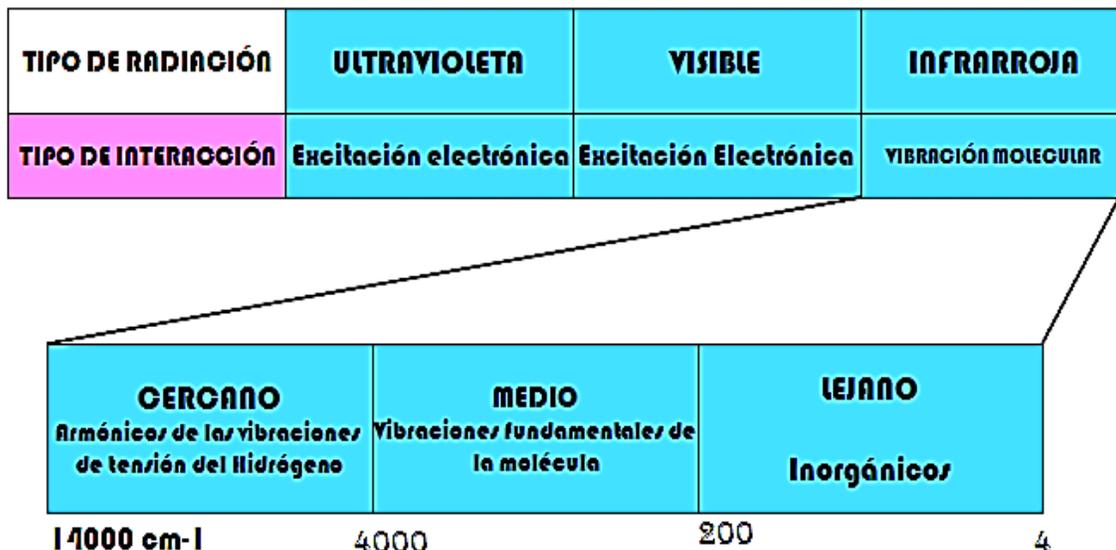


Figura 13. Tipos de radiación y zonas del infrarrojo.

Estas frecuencias vibracionales son establecidas por la forma de las superficies de energía potencial molecular, eventualmente por la interacción entre estados electrónicos y estados vibracionales y por las masas de los átomos. En una molécula se puede determinar que su modo vibracional es activo al infrarrojo cuando sufre cambios en el dipolo permanente.

Las moléculas biatómicas simples tienen solamente un enlace que se puede estirar. Sin embargo, moléculas más complejas pueden tener muchos enlaces y las vibraciones pueden ser conjugadas, llevando a cabo absorciones en el infrarrojo a frecuencias características que pueden relacionarse con distintos grupos químicos. Cuando la radiación infrarroja interactúa con la materia ésta se puede absorber causando que los enlaces químicos de las moléculas vibren. La presencia de enlaces químicos en la materia es una condición necesaria para que la absorción infrarroja ocurra.

Los grupos funcionales de las moléculas tienden a absorber radiación infrarroja en el mismo rango de número de onda. Por ejemplo, el enlace carboxilo (C=O) absorbe a 1700 cm^{-1} en cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos.

Esto significa que existe una correlación entre el número de onda al que una molécula absorbe y su estructura, lo que permite identificar a una molécula a través de sus grupos funcionales por espectroscopía infrarroja (Perkin, Elmer 2003).

La región espectral más utilizada es la del infrarrojo intermedio (MID), que cubre números de onda de 4000 a 200 cm^{-1} . En el Tabla 4. se muestran las posiciones características de algunos grupos funcionales comunes para el MID:

Tabla 4. Absorción de grupos funcionales del espectro de infrarrojo medio

Picos de absorción			
Grupos funcionales		Número de onda cm^{-1}	Longitud de onda μm
O-H	Alifáticos y aromáticos	3600-3000	2.8-3.3
NH ₂	Solo secundarios y terciarios	3600-3100	2.8-3.2
C-H	Aromáticos	3150-3000	3.2-3.3
C-H	Alifáticos	3000-2850	3.3-3.5
C≡N	Nitrilo	2400-2200	4.2-4.6
C≡C-	Alquinos	2260-2100	4.4-4.8
COOR	Ester	1750-1700	5.7-5.9
COOH	Ácidos carboxílicos	1740-1670	5.7-6.0
C=O	Aldehídos y cetonas	1740-1660	5.7-6.0
CONH ₂	Amidas	1720-1640	5.8-6.1
C=C-	Alquenos	1670-1610	6.0-6.2
-O-R	Aromáticos	1300-1180	7.7-8.5
R-O-R	Alifáticos	1160-1060	8.6-9.4

(Perkin, Elmer 2008).

Espectrofotómetro Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

El FTIR utiliza un interferómetro de Michelson de barrido, para obtener una señal en el detector que es muestreada a intervalos precisos controlados mediante una señal de referencia incidente en el detector y que se produce por la modulación de un rayo láser de helio-neón (Willard *et al.*, 1991). La señal resultante en el detector se conoce como interferograma (que se almacena en la memoria del equipo) y

contiene toda la información requerida para construir el espectro por medio de un procedimiento matemático conocido como Transformada de Fourier.

La transformada de Fourier se realiza automáticamente por la computadora del equipo, la cual envía el espectro al monitor de la computadora (Willard *et al.*, 1991; Gallardo *et al.*, 2009).

El uso de láser helio-neón como referencia trae como consecuencia una mayor resolución del espectro con una exactitud de número de onda menor a 0.01 cm^{-1} en el intervalo de 4800 a 400 cm^{-1} . Ya que en el FTIR todas las longitudes de onda se detectan simultáneamente durante el barrido, el interferómetro mejora la relación espectral señal-ruido que un espectrómetro dispersivo, resultando un espectro IR más definido (Figura 14)(Rodríguez-Saona *et al.*, 2006).

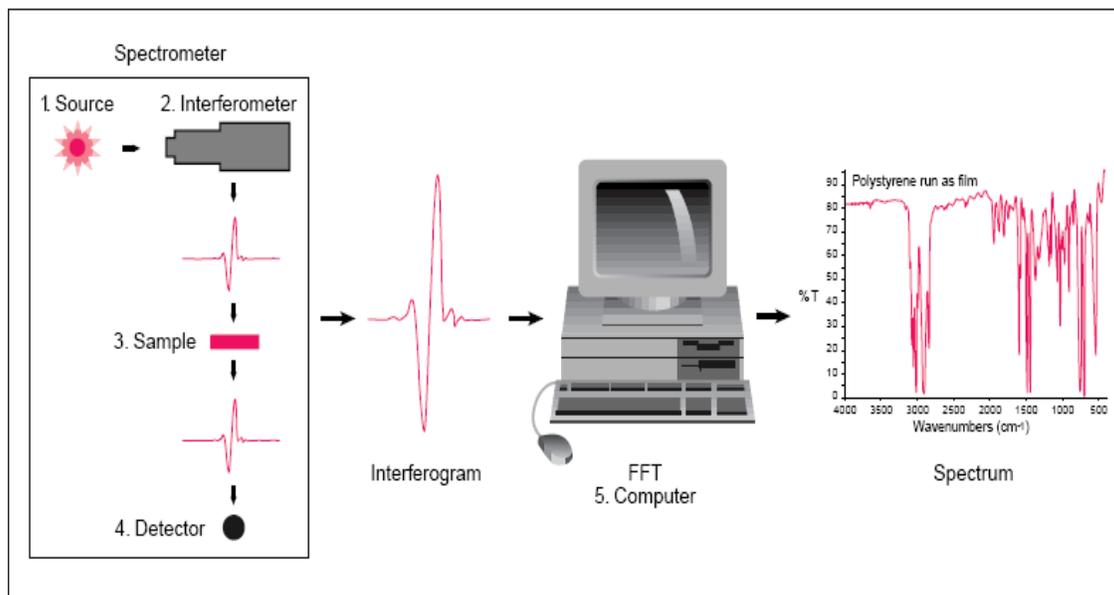


Figura 14. Diagrama del FTIR (Perkin Elmer, 2005).

🚦 Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR)

La instrumentación de MID-FTIR, ha conducido a grandes mejoras en la simplificación de manipulación de la muestra (accesorios de muestreo), así como también mejor resolución tal como la generada por el aditamento de reflectancia total atenuada horizontal (HATR), (Armenta *et al.*, 2005; Gallardo *et al.*, 2008). Esta mejora comprende la inclusión de una celda de HATR, donde la radiación

infrarroja no es guiada a través de la muestra en sí, sino a través de un cristal con alto índice de refracción que está en contacto con la muestra (Etzion *et al.*, 2004). Con esta mejora, el haz se refleja varias veces dentro del cristal antes de ser dirigido hacia el detector.

La forma en la que trabaja este aditamento es promoviendo que el rayo que llega a la superficie reflectante, y que penetra en la muestra hasta una profundidad de aproximadamente $0,1 \lambda$, donde λ es la longitud de onda de la radiación (Mizaikoff, 2002). Pasa al detector y luego a través del interferómetro de Michelson desde donde se detecta la transformada de Fourier de la distribución espectral de la fuente infrarroja de estudio. Esta señal recibe el nombre interferograma que es leído por el equipo de cómputo mediante una inversa a la transformada de Fourier produciendo el espectro de la muestra analizada.

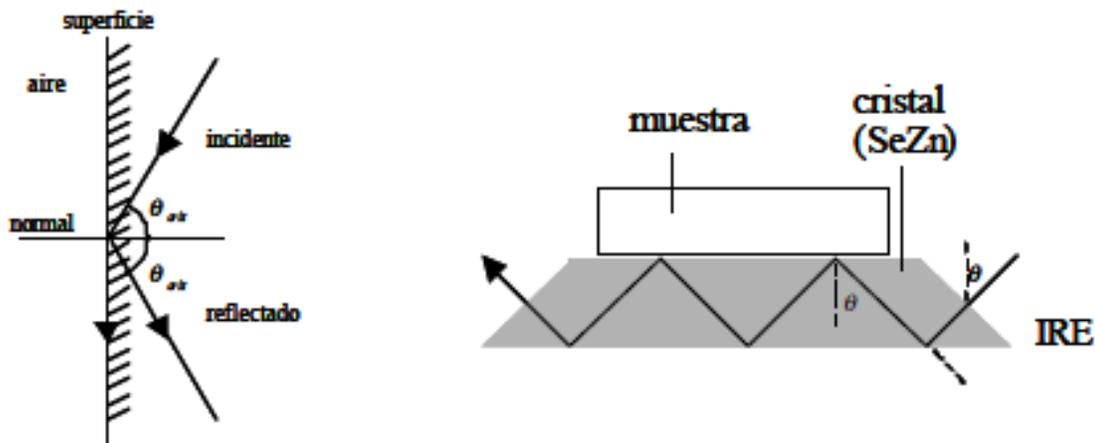


Figura 15. Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR) (adaptado de Perkin Elmer, 2005)

En lo que respecta al ángulo de la luz incidente y la geometría del cristal éstos facilitan que se produzcan sucesivamente reflexiones en sus caras internas (Figura 15). El accesorio permite colocar la muestra de forma horizontal haciendo que las muestras puedan ser líquidas, geles, pastas e incluso polvos (Perkin Elmer, 2003).

Interpretación de espectros

Aunque no hay reglas establecidas para la interpretación de un espectro infrarrojo si existen algunas líneas generales que son de gran utilidad.

1. Comenzar por el lado izquierdo del espectro y hacer un examen preliminar de la región entre 1000 y unos 1500 cm^{-1} (C=O, C=C) y la región próxima a 3000 (OH, NH)
2. Examinar la región de tensión C-H justo por encima de 3000 cm^{-1} buscando indicios de hidrógeno enlazado a carbono insaturado.
3. Examinar el espectro desde 1500 hasta 600 cm^{-1} buscando otros grupos funcionales, tales como éteres halógenos.

Derivación de los espectros

Con el fin de eliminar las dificultades para la asignación de bandas debido al solapamiento de los picos se llevan a cabo correcciones las cuales consisten en el empleo de derivadas. Las derivadas calculan la tangente en cada punto de inflexión del espectro intacto, en el cual no se usa un tratamiento matemático previo. Cada punto de inflexión del espectro puro corresponde a un máximo o mínimo relativo en el espectro de la primera derivada.

En relación a la segunda derivada, ésta refuerza los picos y sobre todo soluciona el solapamiento de picos, ya que cada mínimo del espectro de la segunda derivada corresponde a un máximo del espectro puro. De tal modo que la derivación permite acentuar las diferencias existentes en los datos espectrales.

2.6.2 Métodos Alternativos Espectroscopía

Fundamentos teóricos del método quimiométrico

La quimiometría es la disciplina de la química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos (análisis multivariable) y otros procesamientos del campo para diseñar o seleccionar experimentos o procedimientos de medición óptimos y para obtener la máxima información posible sobre la composición de una muestra, analizando la información espectral de la misma (Otto, 1999). Es conveniente recalcar los siguientes aspectos de los métodos quimiométricos.

La quimiometría sirve para reconocer tendencias en los datos. Puede indicar si un conjunto de muestras es o no homogéneo, si existen muestras que sean discrepantes del resto, que variables de ciertas muestras son diferentes del resto etc. Este tipo de información se obtiene aplicando las técnicas de reconocimiento de modelos, como técnicas de agrupación (*Cluster*) y técnicas de representación.

Los métodos quimiométricos aplicados a la espectroscopía infrarroja, son usados para análisis cualitativos y cuantitativos en numerosas aplicaciones en diversos campos (alimentos, agricultura, medicina, química, farmacéutico, polímeros y cosméticos) (Melgar, 2009).

En la espectroscopía cuantitativa, es fundamental diseñar un experimento de calibración, cuyo propósito es establecer una relación matemática entre el espectro del infrarrojo (IR) y los parámetros químicos del conjunto de muestras analizadas. Una vez que se establece el modelo matemático, se puede ejecutar el análisis de las muestras desconocidas, lo que significa que podrá realizarse la predicción de los parámetros químicos demandados, con base en el espectro IR de esas muestras desconocidas (Büning-Pfaue, 2000).

La quimiometría es un acercamiento estadístico a la interpretación de modelos en datos multivariados. Cuando es usada para analizar los datos instrumentales, la quimiometría resulta a menudo, en una valoración de la composición del alimento o incluso propiedades físicas y sensoriales, más rápida y más precisa. Por ejemplo, la composición (grasa, fibra, humedad, carbohidratos) de productos lácteos o granos, pueden ser medidos rápidamente usando espectroscopía de infrarrojo y quimiometría.

Las propiedades sensoriales de los alimentos (gusto, olor, astringencia) también pueden ser monitoreadas sobre una base continua. En todos los casos, los patrones de datos son usados para desarrollar un modelo con la finalidad de predecir los parámetros de calidad de datos futuros (Infometrix, 1996). Las mayores ventajas del método son la relativa simplicidad de la operación y la

capacidad de producir enormes cantidades de información en un tiempo muy corto (Patz *et al.*, 2004).

Dentro de los aspectos relevantes de los métodos quimiométricos se puede mencionar que:

- ✚ Su naturaleza es predominantemente multivariable.
- ✚ A través de una sola muestra se puede obtener bastante información por espectrometría con la consiguiente necesidad de analizar un extenso conjunto de variables.
- ✚ Al procesar la señal, los datos cuantitativos se obtienen por vía instrumental (Armenta, 2005).

Los métodos quimiométricos presentan las siguientes ventajas con respecto a los métodos tradicionales:

- ✚ Dan un diagnóstico para determinar que la información que se deriva es exacta;
- ✚ Es un método rápido,
- ✚ Se analizan muestras directamente sin pre-tratamiento;
- ✚ No se requiere el uso de otros disolventes;
- ✚ Los equipos tiene una muy buena reproducibilidad (Gallardo *et al.*, 2008).
- ✚ Modelo SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes)

Los modelos de calibración multivariable cualitativos para la interpretación de las bandas de los picos de absorción generados durante el análisis utilizando FTIR se desarrollaron utilizando diferentes algoritmos (Mongay, 2005). El algoritmo con el que cuenta el programa Assure ID es el SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes, por sus siglas en inglés). El algoritmo SIMCA se basa en el análisis de componentes principales (PCs). Se elabora introduciendo un número de espectros conocidos con una característica similar a los que se denominan de población. Pueden introducirse varias poblaciones utilizando este algoritmo. Cuando se introduce un espectro desconocido, al análisis multivariable cualitativo permite definir si dicho espectro desconocido pertenece o no a alguna de las poblaciones definidas con anterioridad. El algoritmo SIMCA permite generar

modelos muy sensibles que son capaces de observar pequeñas diferencias espectrales a la hora de identificar o rechazar un espectro desconocido (Beebe *et al.*, 1998). El método SIMCA desde su introducción por Svante Wold ha sido uno de los métodos de clasificación más utilizados en el control de calidad en las industrias alimenticia y farmacéutica.

En la industria del petróleo se ha utilizado para la detección de adulteraciones en gasolinas. Es un método supervisado de reconocimiento de patrones que se basa en el principio de analogía entre las muestras que pertenecen a una misma clase, y emplea para el cálculo de las distancias los *scores* determinados mediante análisis por componentes principales (PCA). El método SIMCA calcula un modelo PCA para cada clase o categoría presente en el sistema u objeto de estudio, posteriormente integra cada una de las clases y calcula sus límites o fronteras con una probabilidad dada, comúnmente del 99% (Figura 16).

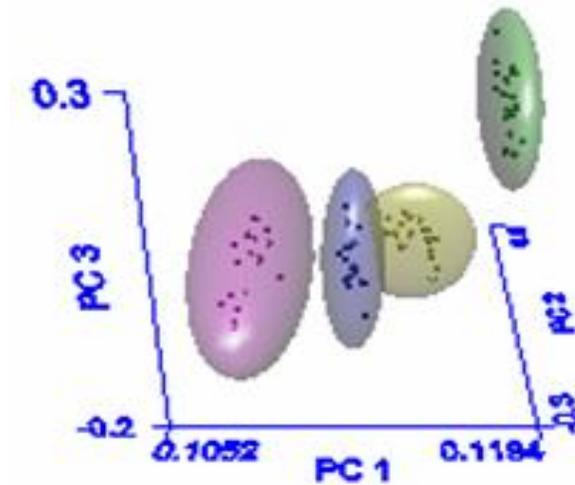


Figura 16. Desarrollo del modelo SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes, por sus siglas en inglés) (Gallardo *et al.*, 2009).

Análisis multivariable cualitativo: programa Assure ID.

El análisis multivariable cualitativo identifica materiales a través de su huella digital que es característica y única para cada producto. Dicho análisis compara el

espectro en el infrarrojo medio de una muestra desconocida con el espectro medio de un grupo de muestras conocidas empleadas como referencias para determinar su similitud y poder así aceptar o rechazar la muestra de estudio como perteneciente o no al grupo de referencia. (Sablani, *et al.*, 2007). En la figura 17 se observa la metodología para la construcción de un modelo de análisis multivariable cualitativo. El modelo se construye a partir de las fases de calibración y validación para posteriormente aplicar el modelo. Cuando se termina la fase de calibración, el siguiente paso es la validación, si el modelo no es satisfactorio se vuelve a calibrar, si el modelo resulta se pasa a su aplicación. Este proceso se repite cuantas veces sea necesario hasta obtener el mejor modelo posible para su aplicación práctica (Melgar, 2009).

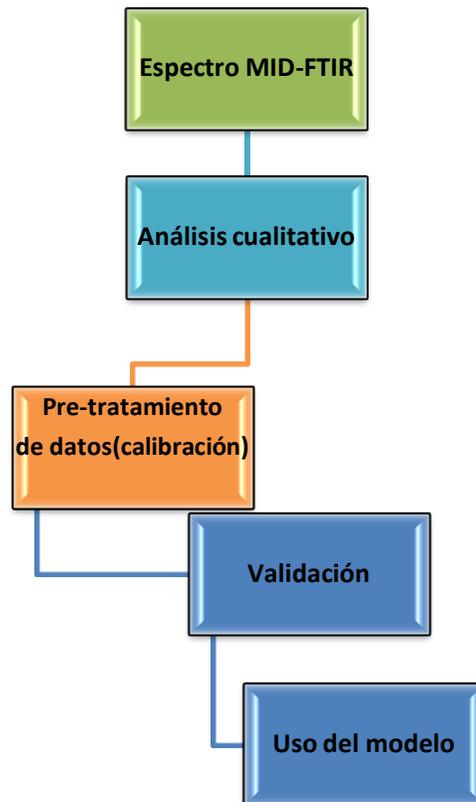


Figura 17. Diagrama del análisis multivariable cualitativo.

✚ Calibración cualitativa: pre-tratamiento de los datos.

Para la elaboración de modelos multivariados cualitativos se utilizan diferentes algoritmos. (Mongay, 2005). El algoritmo con el que cuenta el programa Assure ID

es el SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes, *por sus siglas en inglés*).

SIMCA elabora modelos quimiométricos a partir de sus componentes principales (PCs). Una vez que es alimentado con un número de espectros conocidos con una característica similar a los que se denomina población.

Cuando se introduce un espectro desconocido, permite definir si dicho espectro desconocido pertenece o no a alguna de las poblaciones definidas con anterioridad.

Pre-tratamiento estadístico

Ya determinado el algoritmo con el cual se va a trabajar, existen varios pre-tratamientos estadísticos aplicables a nuestros datos alimentados en el programa Assure ID como son:

-  Filtros: suavizado, ruido espectral y ruido atmosférico;
-  Correcciones a la línea base;
-  Rango o región espectral
-  Regiones en blanco
-  Normalización.

Una vez generando el modelo y llevado a cabo el pre-tratamiento de los datos, el programa da los siguientes datos:

-  **Reporte de la eficiencia de la clasificación:** este parámetro indica qué tan bueno es el método desarrollado para lo cual informa del porcentaje de muestras (espectros alimentados al programa) que es capaz de reconocer o de rechazar.
-  **Número de poblaciones con muestras extremas;** se les llama así a muestras de una población que resultan con una diferencia significativa a la mayoría de las otras muestras que sí representan adecuadamente la población.

- ✚ **Número de poblaciones que se solapan;** son las poblaciones que tienen una o varias muestras representativas de dos o más poblaciones y que por tanto, no se pueden diferenciar debidamente;
- ✚ **Distancia entre las distintas poblaciones:** esta distancia indica qué tan grande es la separación entre las poblaciones analizadas la cual debe ser mayor a 3 para que se considere que las dos poblaciones analizadas son independientes estadísticamente hablando.
- ✚ Otro de los datos de los que provee el SIMCA es el **porcentaje de reconocimiento** el cual indica cuántas muestras de una población determinada es capaz de reconocer como pertenecientes a esa población y el **porcentaje de rechazo** indica cuántas muestras no pertenecientes a una población es capaz de rechazar, es decir, de considerar que no pertenecen a esa población.

✚ **Validación.**

El proceso de validación en análisis cualitativo difiere de la validación en análisis cuantitativo. Aquí las muestras utilizadas en la predicción no forman parte de la matriz de calibración. El programa Assure ID evalúa si la muestra de validación pertenece o no a alguna de las poblaciones de calibración. Por ello, sólo se realiza una validación.

Además mide los siguientes parámetros estadísticos:

- ✚ **Distancia total** al material especificado, la cual es la distancia de la muestra problema a la población de las muestras consideradas en una población. El valor obtenido debe ser menor de 1 para poder clasificar una muestra. Las muestras con distancia total mayor a 1 no se clasifican dentro de las poblaciones.
- ✚ **Distancia límite de la muestra;** este valor debe ser igual a 1, es decir, la muestra problema debe pertenecer a la población analizada;

✚ **Distancia al modelo**; este valor debe ser 0. Una distancia mayor a 0 indica que la muestra se encuentra en los extremos de la población que describe el modelo.

✚ **Distancia residual**; este valor debe ser lo menor posible para que se considere que la muestra pertenece al modelo desarrollado.

Una vez que el modelo ha sido adecuadamente calibrado y se ha comprobado la robustez del mismo mediante la validación puede emplearse con muestras desconocidas.

3. JUSTIFICACIÓN:

Los reportes de investigación epidemiológica en el mundo señalan infecciones relacionadas con la ingesta de carne de animales infectados con *Trichinella spiralis*. Las causas probables son las siguientes: 1) Ingestión de desechos contaminantes por los animales destinados a consumo humano. 2) La falta de control sanitario en la canal del cerdo y caballo en mataderos municipales. Esta situación genera focos probables de infección que representan un riesgo para la salud pública del país.

En México la presencia de *Trichinella* se determina en mataderos mediante las técnicas de triquinoscopía o digestión artificial, las cuales son laboriosas y tardadas. Los únicos mataderos que realizan este tipo de pruebas son los tipo inspección federal (TIF). Los aspectos anteriores marcan la necesidad de buscar nuevas alternativas de diagnóstico sencillas y de corta duración, que pudieran ser aplicadas en detecciones a nivel de comercio internacional. Una posibilidad de sustitución son las técnicas de espectroscopía de infrarrojo medio (MID-FTIR-HATR) ya que existen equipos portátiles con los cuales se puede muestrear y capturar los datos obtenidos en la matriz de un modelo quimiométrico diseñado para este propósito específico, obteniendo así resultados en corto tiempo, sin la necesidad de utilizar reactivos, además de que se utiliza poca muestra y no produce material de desecho.

4. HIPÓTESIS

La técnica de Espectroscopía de infrarrojo medio por transformada de Fourier con la reflectancia total atenuada horizontal aunada a la clasificación de analogía espectral (SIMCA) es un método que puede emplearse para la detección de *Trichinella spiralis* en un sistema modelo murino y en carnes para consumo humano.

5. OBJETIVOS.

5.1. OBJETIVO GENERAL

- ✚ Evaluar la factibilidad de detección de *Trichinella spiralis* en carnes utilizando la clasificación de analogía espectral (SIMCA).

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ Evaluar la factibilidad de elaborar un modelo quimiométrico que permita la detección de *Trichinella spiralis* en carne, empleando un sistema murino (rata).
- ✚ Establecer un método quimiométrico que permita la diferenciación de *Trichinella spiralis* con otras especies de nematodos, en el sistema modelo.
- ✚ Infectar cerdos con *Trichinella spiralis* y elaborar un método quimiométrico que permita la diferenciación de diferentes músculos de cerdo infectados y no infectados (macetero, diafragma, lomo, pierna, costilla) con *Trichinella spiralis*.
- ✚ Validar el modelo quimiométrico diseñado con muestras externas.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

6.1 Desarrollo experimental en el modelo murino

El desarrollo experimental del trabajo se describe de la Figura 18 a 21. Se obtuvieron como animales de experimentación ratas del Instituto Nacional de Referencia (InDRE). Un total de 20 ratas se dividieron en dos grupos de diez, el primero de ratas control (ratas no infectadas) y el segundo de ratas que se infectaron con 7000 larvas (LI) cada una de ellas por vía oral.

Las ratas control se sacrificaron, evisceraron y pelaron para ser molidas hasta formar una pasta homogénea para tomarla muestra para su análisis en el Espectroscopio GX.

Por otra parte, las ratas infectadas se sacrificaron evisceraron y pelaron después de 30 días post-infección para realizarles una digestión artificial; como método de confirmación de la infección se les hizo una Triquinoscopia. Una vez obtenidas las larvas mediante la digestión artificial se procedió a cuantificarlas en el microscopio óptico, posteriormente se dividieron en tres grupos hasta formar un número total de 25 muestras con diferentes número de larvas, el primero grupo fue de 1 a 10 larvas, el segundo de 100 a 1000 y el tercero de 1000 a 5000.

Con el número de larvas dividido se mezcló cada muestra de larvas con 10 g de carne de rata molida la cual se molió y mezcló para poder obtener la muestra.

Las muestras de carne de rata control así como la carne mezclada con larvas se le tomaron los espectros por triplicado, una vez tomados los espectros se procedió a elaborar el modelo SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes) para lo cual se utilizaron 20 espectros de carne de rata control y 25 de carne de rata mezclada con larvas de *Trichinella spiralis*.

Para la validación del modelo SIMCA se ocuparon 20 espectros de carne de rata infectada experimentalmente.

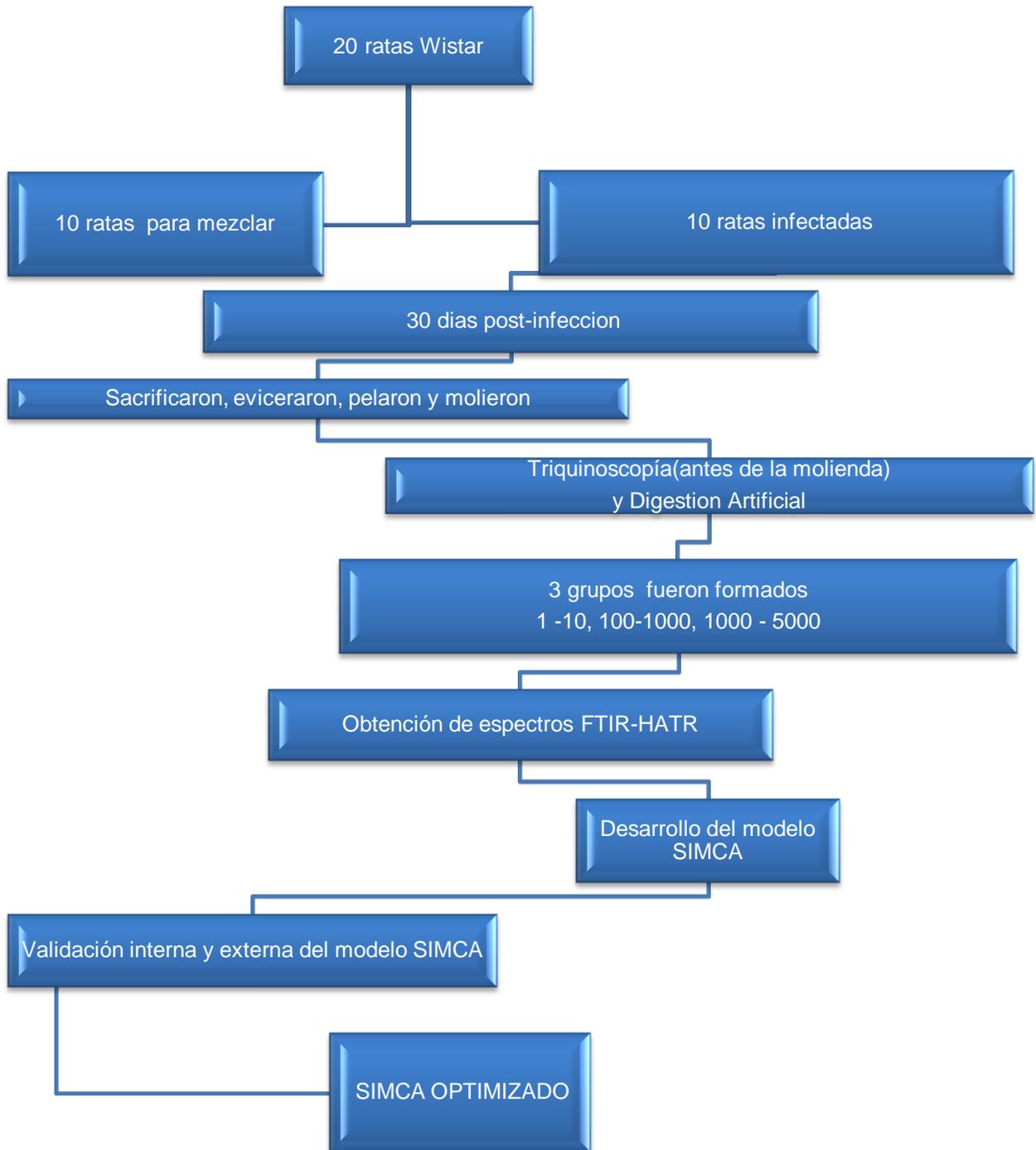


Figura 18. Desarrollo experimental propuesto para la determinación de *T. spiralis* en el modelo murino

6.2 Comparación de parásitos por FTIR-HATR

Una vez realizado el modelo SIMCA optimizado para determinar la presencia de *T. spiralis* en un modelo murino surgió la idea de comparar otros parásitos con el fin de no tener falsos positivos para lo cual se analizaron muestras de *Ascaris lumbricoides* y *Taenia solium* junto con muestras de *T. spiralis* una vez tomados los espectros se utilizaron para crear el modelo quimiométrico (20 espectros de cada parásito) la validación del modelo se realizó con 10 muestras de cada uno de ellos. (Figura 19.)

6.3 Pruebas preliminares para la aplicación de FTIR-HATR-SIMCA a cerdos infectados.

Con el fin de evaluar la viabilidad de llevar esta metodología a cerdos infectados con lavas de *T. spiralis* se hicieron pruebas preliminares para lo cual se analizaron 5 lenguas tanto de rata como de cerdo sin infectar; éstas se molieron por 5 minutos con un procesador de alimentos hasta formar una pasta homogénea para su análisis en el Espectroscopio GX. Del total de espectros tomados se tomaron 15 espectros de cada muestra (lengua de cerdo y lengua de rata) para realizar el modelo SIMCA (Figura 20).

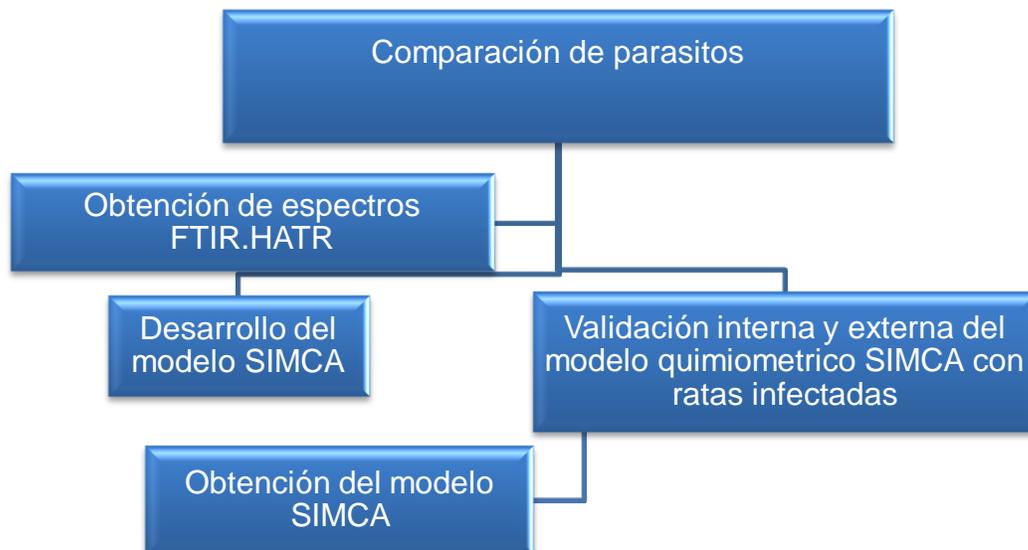


Figura 19. Desarrollo experimental propuesto para el estudio de parásitos



Figura 20. Desarrollo experimental estudios preliminares para la aplicación de FTIR-HATR-SIMCA a cerdos infectados.

6.4. Desarrollo experimental de cerdos infectados

Se obtuvieron como animales de experimentación 7 cerdos de la línea York-Landrace de un mes de edad con un peso de 10 kg los cuales se alimentaron con concentrado comercial (Purina).

Dos de los cerdos se tomaron como testigos o control (sin infectar) cinco cerdos se infectaron por vía oral con diferentes concentraciones de larvas infectantes (LI) de *T. spiralis* (13000, 6500, 3250, 1625, 812, larvas). Se tomaron muestras quincenales de sangre a los cerdos para monitorear la infección por las técnicas inmunológicas de Elisa y Western blot.

Los cerdos se sacrificaron, evisceraron y pelaron después de 6 meses días post-infección; los músculos seleccionados para la determinación por los métodos de triquinoscopía, digestión artificial y FTIR/HATR fueron: **macetero, diafragma, costilla, lomo, pierna.**

Lo primero fue hacer la triquinoscopía (compresión) en la cual se cuantificó el número de larvas enquistadas en las muestras (músculos) posteriormente se

realizó la digestión artificial para lo cual se procedió a cuantificarlas en el microscopio óptico un vez recuperadas por filtrado y sedimentación.

Finalmente se llevó a cabo la determinación de las muestras de los músculos por espectroscopía de infrarrojo, para lo cual las muestras se molieron en un procesador de alimentos por cinco minutos hasta formar una pasta homogénea a la cual se tomaba muestra para su análisis en el Espectroscopio GX. Las muestras de carne de cerdo control así como la carne de cerdo infectado con larvas se les tomaron los espectros por triplicado; una vez tomados los espectros se procedió a elaborar el modelo SIMCA (modelado suave de analogías de clases independientes) para lo cual se utilizaron 100 espectros de músculos infectados y no infectados con larvas de *Trichinella spiralis*. Para la validación del modelo SIMCA se ocuparon 50 espectros de muestras de músculos de cerdo infectado y no infectado (Figura 21).

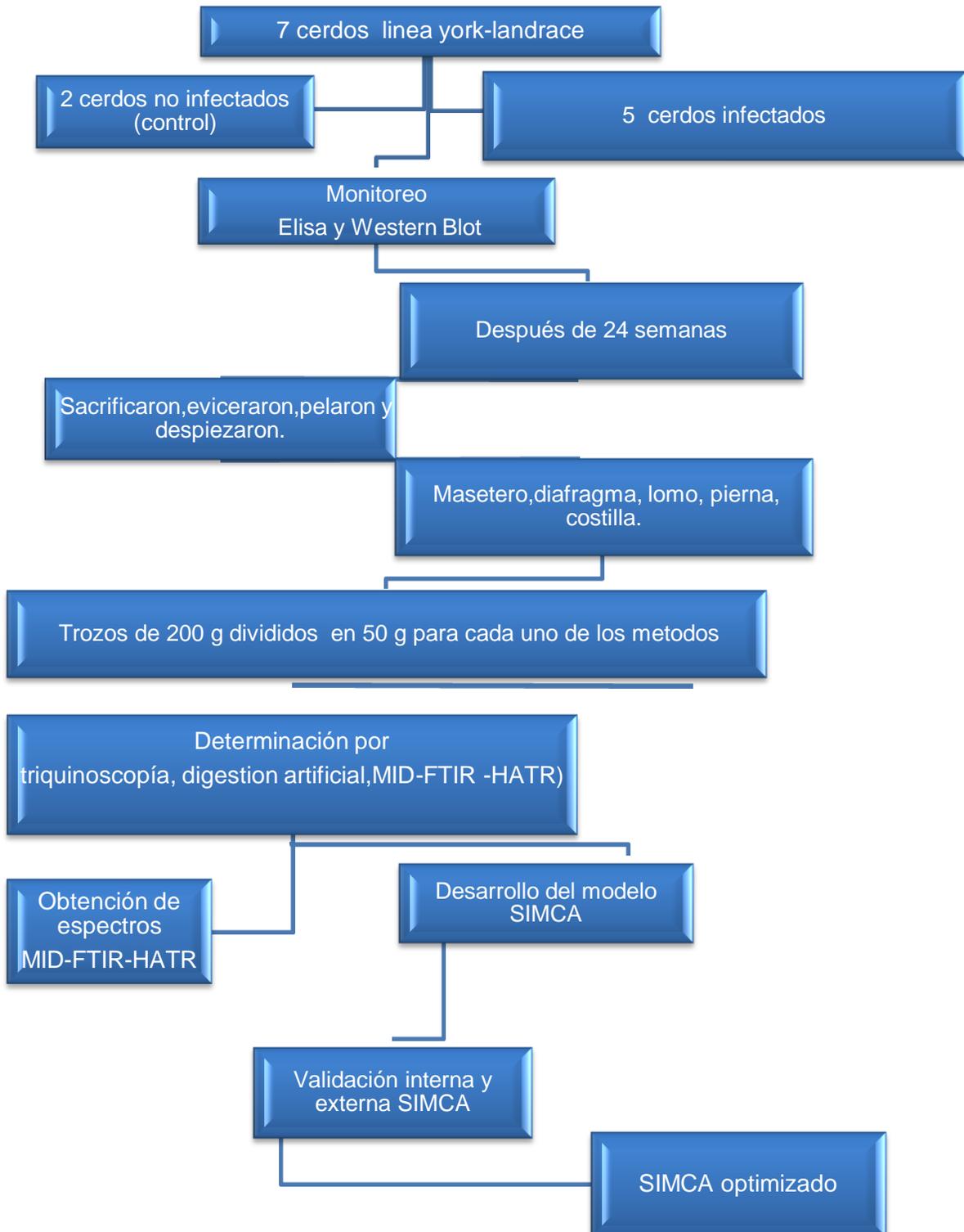


Figura 21. Desarrollo experimental propuesto para cerdos infectados y no infectados con *T. spiralis*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Experimentación del modelo murino.

7.1.1 Modelo experimental.

La cepa (MSUS/ME/92/CM-92) de *Trichinella spiralis* se ha mantenido en el InDRE en ratas de la cepa Wistar y la infección experimental se ha monitoreado por la determinación de anticuerpos mediante el ELISA y Western blot usando los productos de excreción-secreción (PES) de *Trichinella spiralis*.

7.1.2 Mantenimiento de cepa *Trichinella spiralis*

El ciclo de vida del nemátodo *Trichinella spiralis*, correspondiente a la cepa MSUS/ME/92/CM-92 se propagó por infección oral con 7,000 larvas musculares (LM) (23 larvas por gramo de peso, equivalente a una infección masiva) en ratas de la cepa Wistar de sexo indistinto, ocho semanas de edad y 300 gramos de peso. Los animales se albergaron por 40 días en jaulas de plástico de 1.20 m x 0.70 m x 0.40 m con aserrín estéril y se alimentaron *ad libitum* con agua y alimento condensado ambos estériles.

7.1.3. Obtención de larvas musculares

Los animales se sacrificaron con vapores de éter, según lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Se retiró la piel, vísceras y cabeza. El canal se lavó con agua de la llave para retirar la sangre, luego se seccionó en fragmentos de 0.3 cm³ y cada gramo de carne se mezcló con 0.1 g de pepsina, 0.1 ml de HCl con una pureza de 38% (densidad 1.19 a 250C) y 10 mL de agua destilada. La mezcla se agitó de manera continua durante 3 h a 37°C. Al término, la solución de digestión se vertió a través de una gasa colocada en la boca de una copa de precipitación. Después de 30 minutos se colectaron las larvas sedimentadas. Las larvas musculares se lavaron con una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M con NaCl 0.015 M pH 7.2 (solución de

fosfatos); para descartar el sobrenadante, se centrifugó a 1,613 gravedades durante 5 minutos a temperatura ambiente. Con una pipeta Pasteur se extrajo el excedente de tejido. Finalmente, las larvas se sometieron a un gradiente trifásico de dextrosa (20, 40 y 80%), para limpiarlas de los restos de tejido. Las larvas se obtuvieron de la interfase de 20-40% y se repitieron los lavados con solución de fosfatos para eliminar el exceso de dextrosa y se re-suspendieron en 10 ml de solución de fosfatos. Se tomaron 10 uL para contarlas, el promedio de tres cuentas se interpoló para conocer el número total de larvas.

7.1.4. Obtención de la muestras

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas no infectadas del bioterio de ENCB (Escuela Nacional De Ciencias Biológicas) así como ratas infectadas del InDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos).

Ratas Control

Se emplearon 20 ratas Wistar de 350 g. no infectadas, se sacrificaron, y los canales se molieron en un procesador de alimentos.

Ratas Infectadas

Se utilizaron 10 ratas Wistar de 350 g. las cuales fueron infectadas vía oral con 7000 LI de *T. spiralis*. De acuerdo a procedimientos descritos por De la Rosa et al. (1996) and Forbes & Gajadhara (1999). Después de 8 semanas post-infección fueron sacrificadas; se tomaron muestras de tejido muscular (diafragma, macetero, lengua), y se sometieron a los siguientes procesos:

7.1.5. Determinación de *Trichinella spiralis* por triquinoscopía (Compresión).

Después de una observación completa de la canal de rata se extrajo una muestra de aproximadamente 1 g obtenida del diafragma; las muestras se colocaron entre dos portaobjetos se presionaron manualmente para extender la muestra y se

observaron en un microscopio óptico a 40x (Pawlowski, 1983;Capo y Despommier, 1996; Jiménez, 2005).

7.1.6. Digestión artificial.

El proceso se llevó en toda la canal de la rata según el método descrito por Dordevic, 1991; De la Rosa et al. 1998 y Nöckler et al. 2000 en sus investigaciones. La muestra de tejido muscular se colocó en una solución de pepsina-HCL al 1%, durante 3 h y media a 37°C en agitación constante; posteriormente las larvas fueron extraídas por sedimentación y se observaron y contabilizaron en un microscopio óptico.

7.1.7. Preparación de muestras con larvas.

Del número de larvas recuperadas de la digestión artificial se formaron tres grupos 1 a 10, de 100 a 1000 y de 1000 a 5000 éstos se determinó tomando en cuenta una baja, media y alta concentración de larvas con las que se infectan las ratas con el cual se obtuvo al final un total de 25 niveles de larvas para infección. Cada muestra de larvas se incorporó respectivamente en una muestra de carne de 10 g. (por triplicado), obteniendo al final 25 muestras de carne infectadas a diferentes concentraciones, las cuales se molieron en un procesador de alimentos independientemente por un periodo prolongado hasta que se formó una composición pastosa.

7.1.8. Obtención de espectros FTIR-HATR de muestras de carne mezclada con larvas de *Trichinella spiralis* y carne sin infectar.

Se empleó el espectrofotómetro MID-FTIR (Perkin Elmer modelo GX) equipado con un sistema de muestreo por Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR) con un cristal de seleniuro de zinc. Los espectros se registraron a una resolución de 4cm^{-1} en el intervalo de 4000 a 650cm^{-1} con 64 barridos (Scans), con la finalidad de obtener una lectura del espectro con mejor resolución en los picos de absorbancia FTIR. Se aseguró que la muestra tuvieran un buen contacto, después de cada determinación el HATR se limpiaba con pañuelos desechables y con un

cotonete con Extran al 10 % varias veces hasta dejar limpia la superficie del HATR ZnSe (Perkin Elmer, 2008).

7.1.9. Desarrollo del modelo SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes).

Para construir el modelo se utilizaron en total 25 espectros de carne de rata molida mezclada con larvas y 10 de rata control. Para validar el modelo se utilizaron 20 espectros de carne de rata infectada en el laboratorio y 20 espectros de carne de rata sin infectar. Para realizar el SIMCA se realizó un procesamiento de los espectros en donde la región de análisis fue de 1700 a 900 cm^{-1} (región de la huella digital) en la cual se utilizó un filtro Noise Weighing con una corrección de base de tipo derivada en 9 puntos y una normalización MSC en el mismo rango.

7.2. Experimentación en cerdos infectados

7.2.1. Obtención de la muestras

Animales de experimentación

Se utilizaron 7 lechones de la línea York-Landrace, dos cerdos testigo y cinco infectados de un mes de nacidos de 10 kg de peso, los cuales fueron alimentados con concentrado comercial (Purina) los cuales se mantuvieron en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, durante su desarrollo y donde se les tomaron muestras de sangre cada 20 días con el fin de monitorear la infección mediante las técnicas de Elisa y Western blot.

Cerdo control

Se mantuvo hasta los 7 meses al término de los cuales se sacrificó evisceró, peló despiezó y troceó para posteriormente moler los músculos seleccionados en un procesador de alimentos.

Cerdo infectado

Los cinco cerdos restantes se infectaron con larvas de *T. spiralis* en las siguientes concentraciones 13000, 6500, 3250, 1625, 812; posteriormente se sacrificaron a partir del quinto mes, uno cada quince días se sacrificaron evisceraron, pelaron

trocearon, posteriormente se tomaron muestras de tejido muscular (diafragma, macetero, lengua, pierna y lomo), se sometieron a los siguientes procesos:

7.2.2. Determinación de *Trichinella spiralis* por triquinoscopía (compresión)

Después de trocear los músculos de cerdo seleccionados (diafragma, macetero, lengua, pierna y lomo) se colocaron entre dos portaobjetos fuertemente unidos para después observar al microscopio óptico a 20 x (NOM-194-SSA1-2004).

7.2.3. Digestión artificial

El proceso se llevó a cabo en los músculos (diafragma, macetero, lengua, pierna y lomo) seleccionados en los seis cerdos estudiados según el método descrito por el manual de técnicas de laboratorio del InDRE 2007, donde se colocó el tejido muscular en una solución de pepsina- ácido clorhídrico al 1%, durante 3 h y media a 37°C en agitación constante; posteriormente las larvas fueron extraídas por sedimentación y se observaron y contabilizaron en un microscopio óptico.

7.2.4 Obtención antígeno para pruebas de Elisa y Western blot

Las larvas se aislaron por digestión artificial; después de contarlas y limpiarlas de los detritos se hicieron cinco lavados con solución de fosfatos estéril que contenía una mezcla de antibióticos (500 U/mL de penicilina y 500 ug/mL de estreptomicina, los lavados se hicieron centrifugando a 1,613 gravedades durante 5 minutos a temperatura ambiente y descartando el sobrenadante en cada ocasión. Después, se hicieron dos lavados con medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco) que contiene de 2 g de bicarbonato de sodio, 2 g de HEPES y una mezcla de antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 ug/ml de estreptomicina y 0.25 ug/ml de fungizona; BioxWhitaker, Walkersville, MD), se ajustó el pH a 7.2. Las larvas se cultivaron en frascos para cultivo de 15 mL (Corning), a 37⁰C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante 48 h en proporción de 10,000 larvas por cada 100 uL de medio (Dzbenksi et al. 1994). El cultivo se revisó a cuatro aumentos en microscopio invertido diariamente para verificar que no existía contaminación; cada 24 h el medio de cultivo se recuperó según vire de naranja a ámbar y se sustituyó con medio nuevo. La recuperación de medio se realizó un

par de veces dependiendo de la motilidad e integridad de las larvas. El medio recuperado se juntó y se concentró por ósmosis contra azúcar sólido, luego se dializó contra solución de fosfatos por 18 h y se determinó concentración de proteínas por un método colorimétrico (Bio-Rad). Por cada 850 ul de sobrenadante de cultivo se adicionaron 50 ul de TPCK (1mg/ml en metanol), 50 ul de TPCK (1mg/ml en agua), 40 ul de PHMB (0.04% en NaOH 2N), 6 ul PMSF (0.06% en isopropanol) y 4 ul de EDTA (1M) como inhibidores enzimáticos (Nöckler, 2009). El antígeno se almacenó primero a -20°C y luego a -70°C hasta su uso (Dzbencki et al. 1994; Nöckler, 2009).

7.2.5. Diálisis

En este proceso se empleó membrana de celulosa (SPECTRA/POR[®]) de poro molecular 6000 a 8000 Da; previo a su utilización, la membrana se hirvió en agua destilada para eliminar la glicerina (humectante) y algunos compuestos sulfurosos que pudieran interferir con el uso del dializado, después del tratamiento y sin dejar que la membrana se secase, se amarró un extremo del tubo con hilo de algodón, se vertió por el otro extremo la solución a dializar y se amarró el otro extremo formando una bolsa.

La bolsa se colocó dentro de un recipiente que contenía 2L de la solución amortiguadora, aunque pueden utilizarse otros amortiguadores (carbonatos, citratos, etc.). La diálisis se mantuvo en agitación y a 4°C por toda la noche, al día siguiente se realizó un cambio de solución de fosfatos y se agitó a 4°C por 4 h, con ayuda de una jeringa se extrajo la solución dializada. Se determinó la concentración de proteínas por algún método colorimétrico como el de Bradford. La solución se almacenó a -20°C y posteriormente a -70°C hasta su uso.

7.2.6. Monitoreo post infección de *Trichinella spiralis* por métodos inmunológicos de Elisa y Western blot

Se tomaron muestras quincenales de sangre de los seis cerdos en experimentación, ya con los sueros obtenidos se evaluó la presencia de *T. spiralis* en los cerdos infectados y se confirmó con las pruebas inmunológicas de

Western blot con el fin de asegurar el desarrollo de la enfermedad en los animales de experimentación.

7.2.7. Ensayo Inmunoenzimático para la detección de anticuerpos séricos (Elisa)

Placas de ELISA (Cornig Costar) se sensibilizaron por 18 h a 4^oC con 50 uL por pozo con los productos excreción-secreción (PES) diluido a 5 ug /mL en un amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6. Al término se tiró el antígeno y los pozos se lavaron cuatro veces en un lavador de placas de microtitulación con 200 uL de solución de fosfatos adicionado con tween 20 al 0.05%. Los sitios libres de los pozos, se bloquearon con una solución de leche semidescremada diluida al 5% en solución de fosfatos-T durante 1 hora a 37^oC. Al término se hicieron los lavados. En los pozos se colocaron 50 uL de una dilución de suero 1:500 en solución de fosfatos-T y se incubaron durante 30 minutos a 37^oC y posteriormente se hicieron lavados. Para revelar la reacción antígeno anticuerpo se empleó un conjugado de anticuerpos contra IgG de rata acoplados a peroxidasa, posterior a su titulación, para determinar la dilución óptima de trabajo, se colocaron 50 uL por pozo y se incubaron durante 30 minutos a 37^oC. Luego de los lavados, la reacción se puso en evidencia con 50 uL/pozo de una solución de cromógeno preparada con 10 mL de una solución amortiguadora de citratos 0.1M pH 5, 5 mg de orto-fenilendiamina (Sigma) que contiene 10 uL de H₂O₂ (Merck) al 30%. Se incubó durante 10 minutos (cuando los testigos negativos comienzan a virar) a temperatura ambiente en oscuridad y la reacción se detuvo agregando 50 uL/pozo de H₂SO₄ 2 N. La absorbancia fue leída a 490 nanómetros utilizando un lector automático para placas de ELISA (Tinoco et al. 2002; Hassan et al. 2010).

7.2.8. Western blot

El antígeno se sometió a electroforesis en geles preparativos de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sodio al 12% en condiciones reductoras, usando una cámara MiniProtean (Bio Rad). El sistema de geles se preparó de acuerdo a las

instrucciones del fabricante. Se emplearon 100 ug de antígeno diluido en un volumen igual de una solución para separar las proteínas (SDS 10%, 1 ml; ácido etilendinitrilotetraacético, 7.4 mg; glicerina, 1 ml; tris hidrocloreto 2 M pH 6.8, 250 ul; azul de bromofenol y agua destilada para completar 10 ml). Cada mililitro de la solución para separar las proteínas se mezcló con 100 ul de beta-mercaptoetanol y se procedió a hervir en baño María por 5 minutos. La electroforesis se efectuó en presencia de una solución amortiguadora (tris hidroximetil aminometano, 3.6 g; glicina, 27.6 g; SDS 10%, 12 ml; agua destilada, 1,500 ml), aplicando una corriente de 200 volts durante 1 hora en baño de hielo. Después de la electroforesis, la transferencia se llevó a cabo en una cámara de la marca Bio-Rad de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En un recipiente con el amortiguador de transferencia (tris hidroximetil aminometano, 3.08 g; glicina, 14.48 g; metanol, 200 ml; agua destilada, 800 ml) durante 15 minutos. En el mismo recipiente se colocó el papel de nitrocelulosa (NC) de 0.45 um de poro (Schleicher and Schuell) y aditamentos de la cámara de transferencia (Figura 3). La transferencia se llevó al cabo a 200 volts durante una hora en cámara de hielo. La tira con los marcadores de peso molecular fueron cortadas y la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Sigma) al 0.2% en ácido tricloroacético 0.3% (Merck) para observar si la transferencia de las proteínas fue adecuada, luego se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se bloqueó con leche semidescremada al 5% en solución amortiguadora de fosfatos adicionada con Tween 20 por 18 h. El proceso de lavado consistió en 3 tiempos con solución amortiguadora de fosfatos adicionada con Tween 20 y 2 veces con solución de fosfatos durante 5 minutos cada uno. Se cortaron tiras de 0.4 mm de ancho.

La electrotransferencia tiene como objetivo transferir a una membrana de papel de nitrocelulosa, proteínas previamente separadas por una electroforesis, donde las glicoproteínas son transferidas del cátodo (polo negativo) al ánodo (polo positivo) (Pozio *et al.*, 2002).

Las tiras previamente cortadas se usaron en solución amortiguadora de fosfatos adicionada con Tween 20 durante 2 h a temperatura ambiente en agitación continua. Después de los lavados, las tiras se incubaron con un conjugado de

anticuerpos contra IgG de rata acoplados a peroxidasa diluido en solución amortiguadora de fosfatos adicionada con Tween 20. Después de los lavados, la reacción se reveló empleando 50 mg de 4-cloro-1-naftol diluido en 10 ml de metanol, 50 ml de solución de fosfatos y 10 ul de H₂O₂ al 30%. Una vez que aparecieron las bandas, se retiró el substrato y la reacción se detuvo con agua destilada. Las tiras se secaron sobre papel filtro (Pozio et al., 2002).

7.2.9. Obtención de espectros FTIR-HATR de muestras de carne de cerdo infectado con *Trichinella spiralis* y carne de cerdo control.

Se empleó el espectrofotómetro MID-FTIR (Perkin Elmer modelo GX) equipado con un sistema de muestreo por Reflectancia Total Atenuada Horizontal (HATR). Los espectros se registraron a una resolución de 4cm⁻¹ en el intervalo de 4000 a 650 cm⁻¹ con 64 barridos (Scans), con la finalidad de obtener una lectura del espectro con mejor resolución en los picos de absorbancia FTIR. Se aseguró que la muestra y el cristal de ZnSe tuvieran un buen contacto, después de cada determinación el HATR se limpiaba con un cotonete que contenía Extran al 10 % varias veces hasta dejar limpia la superficie (Perkin Elmer, 2008).

7.2.10. Desarrollo del modelo SIMCA.

Para construir el modelo se utilizaron los mejores espectros, en total 100, de carne de cerdo infectado con *T. spiralis* y 100 de cerdo control. Para validar el modelo se utilizaron 50 espectros de carne de cerdo infectada y 50 espectros de carne de cerdo sin infectar. Para realizar el SIMCA se realizó un procesamiento de los espectros en donde la región de análisis fue de 1700 a 900 cm⁻¹ (región de la huella digital) en la cual se utilizó un filtro Noise Weighing con una corrección de base de tipo derivada en 9 puntos y una Normalización MSC en el mismo rango.

8. RESULTADOS

8.1. Determinación de *T. spiralis* en el modelo murino.

Los resultados se agrupan en 3 secciones:

- 1- Caracterización de la materia prima (carne de rata y larva muscular)
- 2- Interpretación de los espectros FTIR-HATR
- 3- Desarrollo del modelo SIMCA (Modelado suave de analogías de clases independientes)

8.1.1. Caracterización espectral de la materia prima

Esto se hizo con el fin de realizar pruebas preliminares para determinar la factibilidad de que el espectro de infrarrojo por transformada de Fourier, identificara la presencia de la larva de *Trichinella spiralis*. En la Figura 22 se pueden observar que los picos más significativos del parásito están en la región de 1700 a 900 cm^{-1} , la cual se seleccionó para hacer el modelo SIMCA.

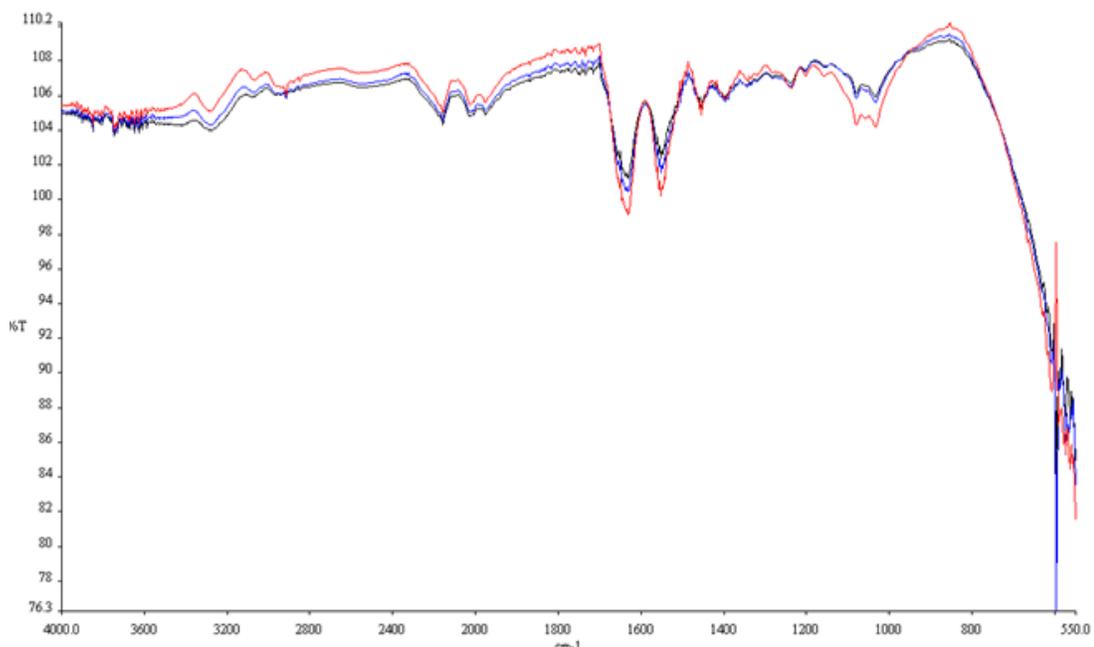


Figura 22. Espectros de larvas de *Trichinella spiralis*.

La Figura 23 muestra los espectros de FTIR-HATR para muestras de larva de *Trichinella spiralis* (Figura 23c), carne de rata infectada experimentalmente (Figura 23b), carne de rata mezclada con larva (Figura 23a) y carne de ratas Wistar sin infectar (Fig.23d), todas evaluadas en la región de 1700-900 cm^{-1} , donde se aprecian las principales diferencias entre los valores de los picos de los espectros de rata control con respecto a los demás.

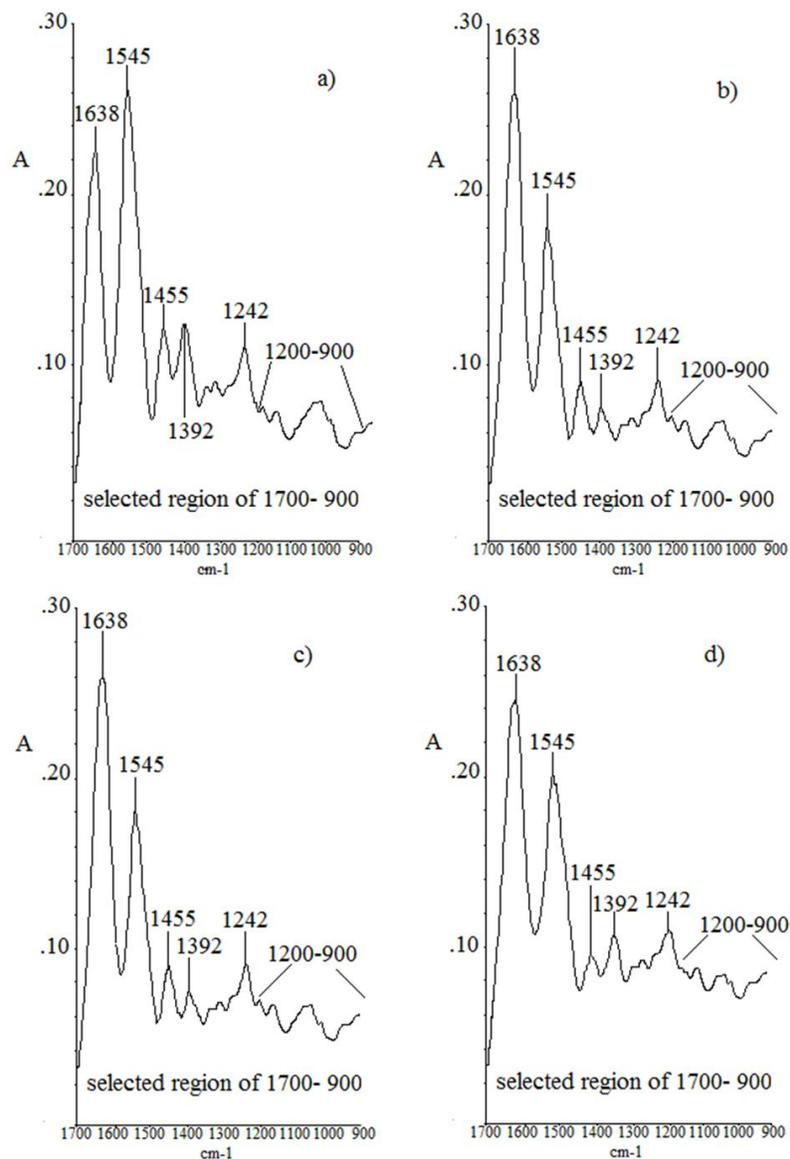


Figura 23. (a) Espectros de carne infectada con *T.spiralis* (b) espectro de carne infectada experimentalmente.(c) espectro de larva de *T. spiralis* (d) espectros de carne no infectada.

De esta figura se puede apreciar que el espectro de Larva muscular, carne normal y mezclada con *T. spiralis* es similar a la del espectro de la carne infectada en las bandas de amida I a 1638 cm^{-1} y amida II en 1545 cm^{-1} , así como, las bandas de amida de 1400 a 900 cm^{-1} . Según Kilgore et al. (1986), la larva muscular presenta como parte de su composición proteínas, glucosa, trehalosa, tivelosa y glucógeno, por lo tanto, el incremento observado en la región de 1200 a las bandas de 900 cm^{-1} se podría atribuir a la presencia de glucógeno e hidratos de carbono (Al-Jowder et al 1997).

La Figura 24 muestra un grupo de espectros de muestras de carne de rata mezclada con diferentes cantidades de larvas musculares, donde se observa la variación en la respuesta en función de la concentración de larvas presentes, aumentando el valor de la absorbancia al aumentar la concentración.

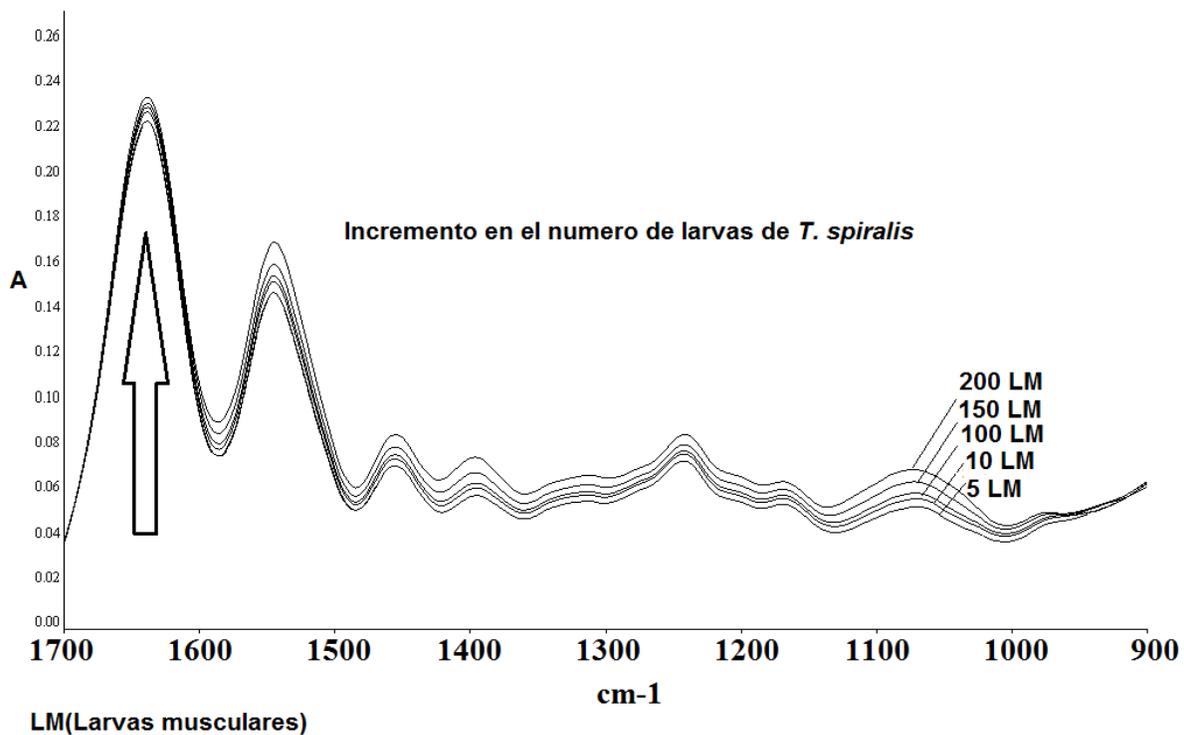


Figura 24. Espectros de carne de rata mezclada con diferentes números de larvas de *T. spiralis*.

La Figura 25 muestra la primera derivada de los espectros originales en donde se reforzaron los picos para amplificar pequeñas diferencias entre los espectros de carne de rata mezclada con larvas y carne control sometidos a análisis SIMCA. Este tratamiento se reflejó en una mejor diferenciación entre los picos de la carne de rata control (espectro color verde) y la carne de rata mezclada con larvas de *Trichinella spiralis* (espectros en color azul) observándose una mayor variación en la zona de la huella digital (Figura 25b) en donde se tomó el intervalo de 1700 a 900 cm^{-1} para la elaboración del modelo SIMCA.

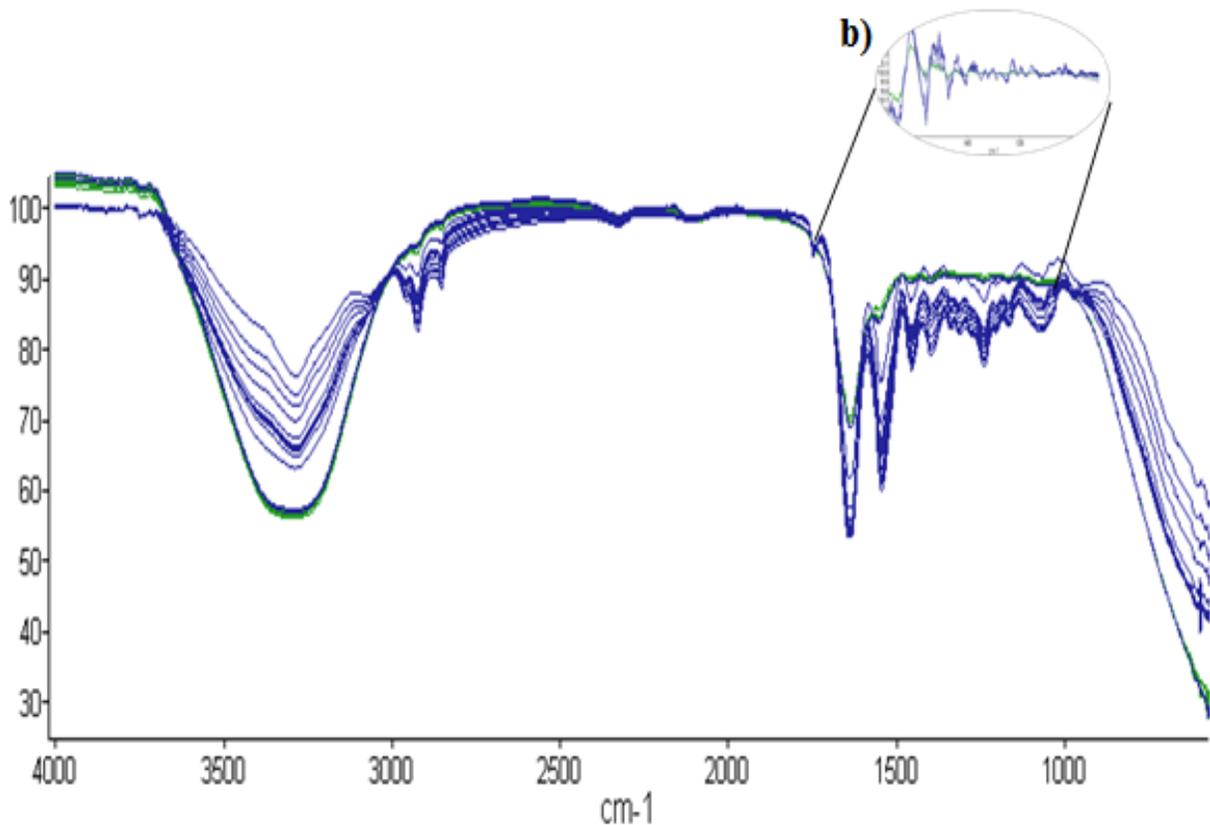


Figura 25 Espectros de carne de rata a) Espectro completo b) Región de huella digital (muestras mezcladas con *T. spiralis* en color azul y mezclas control en color verde)

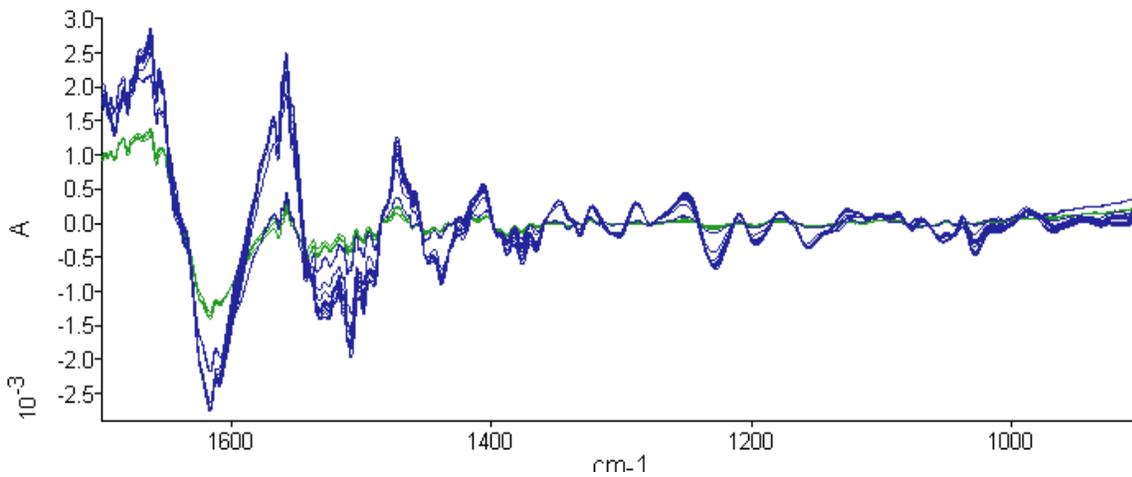


Figura 25 b) Región de 1700 a 900 utilizada para realización del modelo SIMCA tratada con la primera derivada.

8.1.2. Discriminación de espectros de carne de rata mezclada con larvas y carne control por SIMCA

Con el fin de desarrollar el modelo de discriminación de carne de rata mezclada y no mezclada con larvas de *Trichinella spiralis*, la colección espectral (25 muestras de carne con *T. spiralis* y 20 muestras control) fueron sometidos a análisis SIMCA.

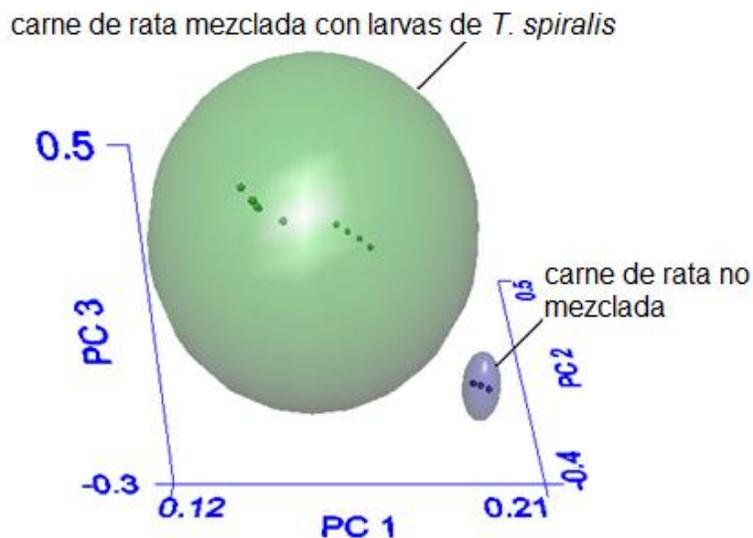


Figura 26. Modelo tridimensional SIMCA de carne de rata mezclada con *T. spiralis* y carne control. (Análisis de componentes).

La figura 26 ayuda a visualizar la separación de clase entre carne mezcladas con larvas y carne control. Como puede verse en la figura existe una excelente separación del grupo entre los espectros de carne de ratas control y de carne de rata mezcladas con *T. spiralis*. El límite alrededor de cada grupo (elipse) representa el 99% intervalo de confianza y cada punto de datos en el cluster representa un espectro de carne de rata.

Como se observa en la Tabla 5 la distancia inter-clase resultó adecuada ya que se obtuvo un resultado de 36.5, teniendo en cuenta que como regla general debe de existir un mínimo de 3 entre una muestra y otra (Edelmann *et al.*, 2001; He *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2010). Esta distancia inter-clase sugiere la capacidad del modelo espectral (SIMCA) para discriminar diferencias sutiles entre carne control y la carne de rata mezclada con larvas. Es importante recordar que la concentración mínima de larvas que podrían ser objeto de discriminación fue de tres larvas/10g del tejido muscular, en comparación con otros autores que han evaluado a través de triquinoscopía, y donde mencionan que quince o más larvas/g de músculo son necesarias para la detección, mientras que por digestión artificial sólo requieren de cuatro larvas/g (Van Knappen *et al.*, 1980; Kohler *et al.*, 1983; Vignau, 1997).

Tabla 5. Distancia inter-clase de rata control y mezclada con *T. spiralis*.

	Carne de rata control	Carne de rata mezclada con larvas
Carne de rata control	-	36.5

En la Tabla 6 se muestran los resultados del análisis SIMCA, basado en el porcentaje de reconocimiento y de tasas de rechazo. De acuerdo a los resultados obtenidos se presenta un 100% de reconocimiento entre las carnes infectadas y sin infectar, incluso en concentraciones tan bajas como tres larvas/10g del tejido muscular; el modelo se validó con las 10 muestras de carne de rata no infectadas y las 10 muestras de carne de rata infectada experimentalmente las cuales fueron correctamente clasificadas.

Una ventaja importante de SIMCA es la capacidad de determinar si una muestra pertenece o no alguna de las categorías predefinidas de ahí que el análisis pudo evaluar dos posibles resultados, (i) la muestra se clasificó adecuadamente a las categorías predefinidas (carne de rata infectada o carne de rata no infectada) y (ii) la muestra no se ajusta a ninguna de las categorías lo que implicaría que la carne la muestra es de una fuente diferente (De Maesschalck et al. 1999).

Tabla 6. Clasificación de resultados de carne control y mezclada con larvas de *T. spiralis*.

	% tasa de reconocimiento	% tasa de rechazo
Carne de rata control	100(20/20)	100 (25/25)
Carne de rata mezclada con larvas de <i>T. spiralis</i> .	100(25/25)	100 (20/20)

8.1.3. Discriminación de parásitos por SIMCA

Para no tener falsos positivos con otros nematodos, se elaboró otro modelo quimiométrico con *Ascaris lumbricoides*, *Taenia solium* y *Trichinella spiralis* (Figura 27) obteniendo los siguientes resultados (Tabla 7).

Tabla 7. Distancia inter-clase de parásitos

	<i>Taenia solium</i>	<i>A. lumbricoides</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
<i>Taenia Solium</i>	-	13.5	19
<i>Ascaris</i>		-	15

Tabla 8 Resultados del SIMCA para la clasificación de parásitos

	% tasa de reconocimiento	% tasa de rechazo
<i>Taenia Solium</i>	100(20/20)	100(40/40)
<i>A.lumbricoides</i>	100(20/20)	100(40/40)
<i>Trichinella spiralis</i>	100(20/20)	100(40/40)

Como se observa en la Tabla 7 el espacio inter-clase en este modelo de SIMCA fue muy significativo entre cada uno de los grupos de espectros analizados de los parásitos. En el Tabla 8 se observa un cien por ciento de reconocimiento de cada muestra.

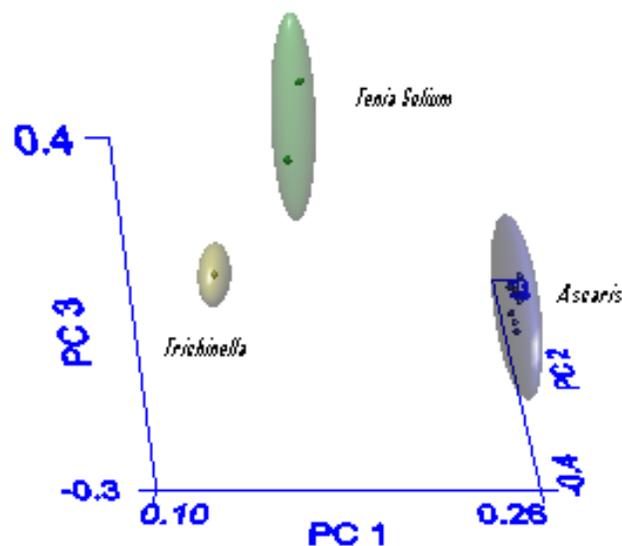


Figura 27. Distribución espacial de las poblaciones obtenidas con el modelo SIMCA optimado.

En la Figura 27 se observa la buena separación de clase entre *Trichinella spiralis*, *Ascaris* y *Taenia solium* del modelo SIMCA en el cual se observa que el modelo es capaz de detectar cada uno de los nematodos y separarlos.

La FTIR/HATR y el SIMCA se ha empleado para crear modelos de análisis cuantitativos similares los cuales han sido empleados con éxito para diferenciación rápida y clasificación, o la identificación de Microorganismos (Alexandrakis et al, 2008; Yu et al., 2005), en muestras de biopsias de tejido estomacal se detectó células cancerígenas (Park et al., 2007), adulteración de los alimentos (Gallardo et al, 2009; He et al, 2007; Defernez et al ., 1995), la variedad o procedencia geográfica de los productos naturales (Pérez et al., 2001;Downey et al., 1997) entre otras aplicaciones ya ha sido demostrada.

Al igual que en el presente trabajo, los estudios citados corroboran que los modelos SIMCA son técnicas confiables y precisas, útiles en la clasificación y discriminación de poblaciones de muestras, capaz de reconocer si pertenecen o no a las poblaciones establecidas en el mismo.

Con base en estos resultados, esta metodología se extendió a la carne de cerdo.

8.2 .Determinación de *T. spiralis* en cerdo infectados experimentalmente

El efecto de la concentración muscular de las larvas en la producción de anticuerpos IgG se muestra en la Figura 28. Después de la infección, los anticuerpos IgG sólo pueden ser detectados después de 3 semanas post-infección (20 días), continuando su incremento entre más días de infección. En cuanto a la concentración de larvas no hubo ningún efecto sobre la producción de anticuerpos, lo que significa que el grado de respuesta de cerdo infectado era independiente de la dosis de larvas que se le suministró.

Los resultados obtenidos son acordes con lo reportado por otros autores, que han indicado que sólo después de 21 días después de la inoculación se detectan anticuerpos de *T. spiralis* (Gamble, 1996; van der Leek, 1992; Ribicich, et al. 2000; Beck et al., 2005)(Ver Figura 28).

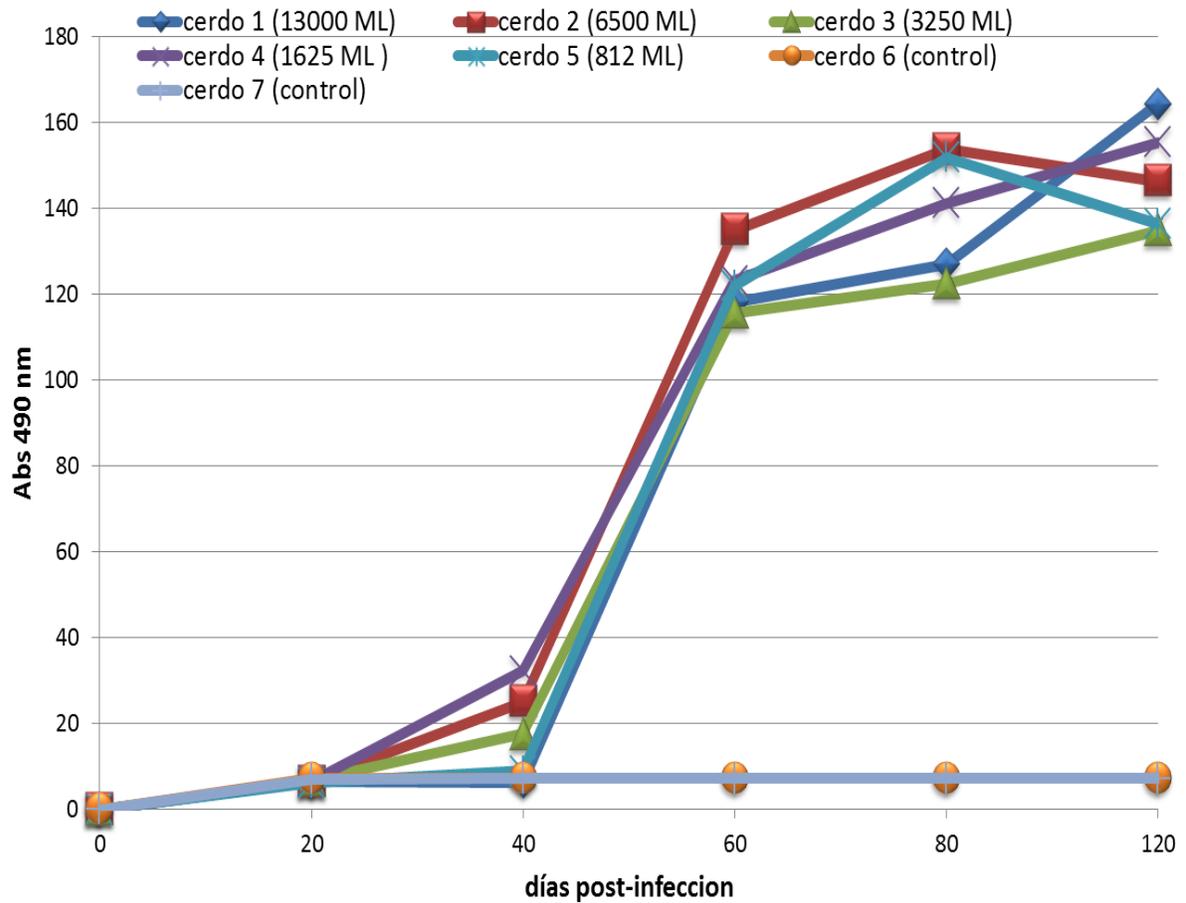


Figura 28 Valores de absorbancia obtenidos de las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Trichinella spiralis*.

Lo siguiente fue el empleo de la técnica de Western blot la cual es más específica y se utiliza para aclarar resultados dudosos del ELISA (figura 29).

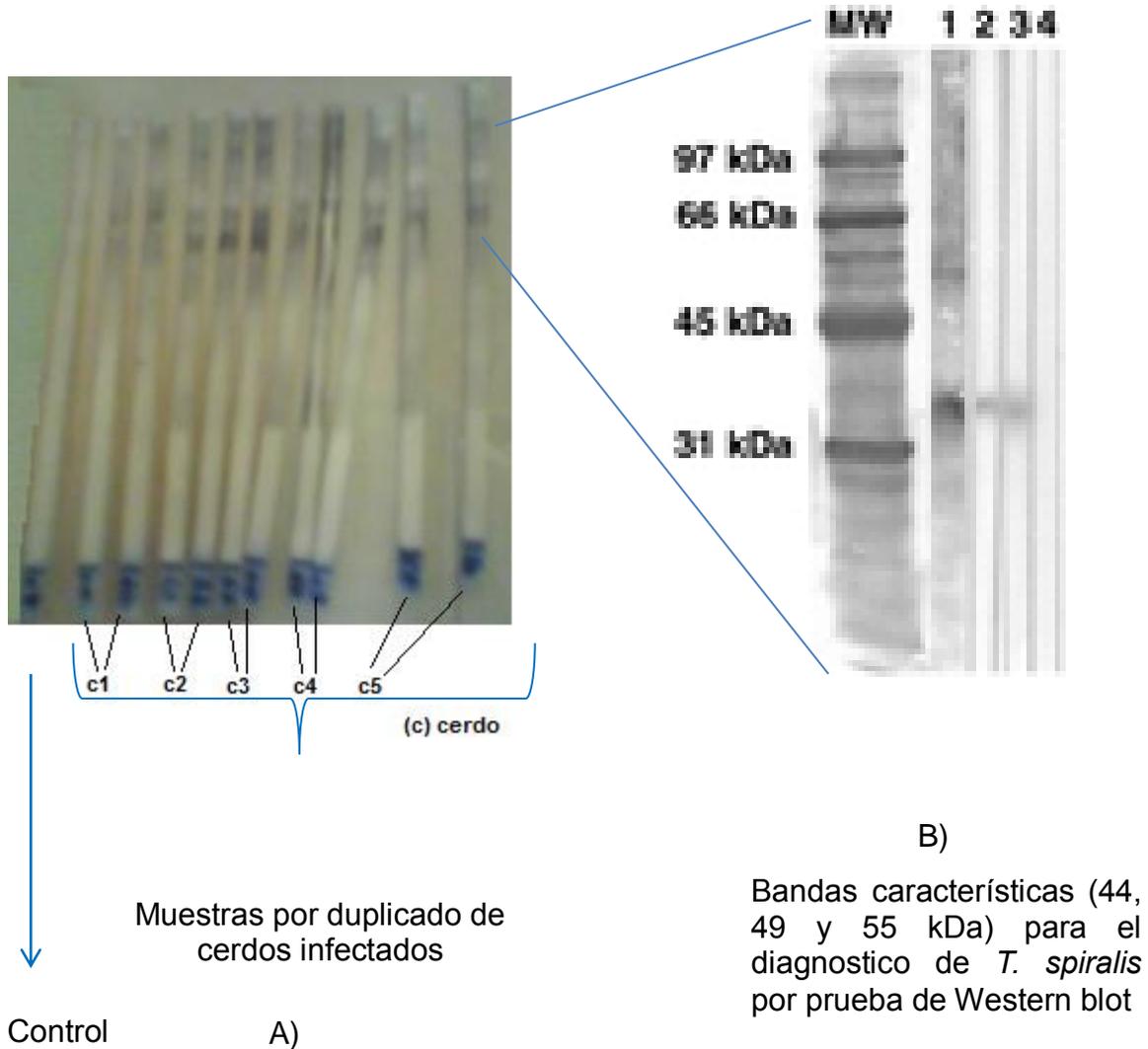


Figura 29. Presencia de anticuerpos contra *Trichinella spiralis* después de la infección por la técnica de Western blot.

Las bandas correspondientes a las proteínas consideradas como diagnósticas para la determinación *T. spiralis*, son aquellas con peso molecular relativo de 44, 49 y 55 kDa mismas que se presentaron en las tiras de Western blot de las muestras de cerdos infectados (figura 27) (Moller *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2010)

8.2.1. Análisis de datos del estudio de cerdos infectados por los métodos de triquinoscopía y digestión artificial

Las diferencias entre los métodos de triquinoscopía y la digestión, para los diferentes músculos de carne de cerdo infectado, se presentan en la Figura 30. Bajo esta perspectiva, el análisis de ANOVA no detectó diferencias significativas ($P = 0,725$) entre ambos métodos. Estos resultados concuerdan con el estudio establecido por Vignau y colaboradores (2003) donde reportaron que el uso de triquinoscopía es equivalente al de digestión artificial y solo presentan diferencia a la sensibilidad ambos métodos, debido a los errores en la aplicación de la técnica. Ribicich (2010) en muestras obtenidas de cerdos inoculados con 5000 y 50000 larvas de *T. spiralis* obtuvo resultados que son concordantes con los de esta investigación ya que no encontraron diferencias significativas entre los dos métodos ($p > 0.05$).

En este contexto se realizó el análisis de varianza de los músculos seleccionados (**diafragma, macetero, lomo, diafragma y costilla**) los resultados indican que no hay diferencia significativa entre costilla, lomo y pierna, (subgrupo 1) pero si existe entre diferencia significativa entre el subgrupo 1 y el subgrupo 2 constituido por diafragma y macetero, al hacer las comparaciones múltiples de TUKEY ($P > 0,05$) con un nivel de confianza del 99.33%. Estudiando los análisis pudo determinarse que los músculos con mayor cantidad de larvas de *Trichinella spiralis* fueron el diafragma y el masetero mientras que la cantidad en los demás músculos fue menor. Resultados similares fueron reportados por Mikkonen *et al.* (2001), pero en un experimento llevado a cabo con perros, donde se cita que el masetero y el diafragma mostraron la mayor concentración de infección por *Trichinella*, de igual modo Ribicich (2010) reportó que los músculos de interés parasitológico y en los que concentran la mayor cantidad de larvas de *T spiralis* en la especie porcina, son el diafragma, maseteros, intercostales y lengua. Ambos tipos de metodologías son sensibles a la concentración de larvas, pero cabe resaltar que la digestión artificial es la única técnica de diagnóstico de *T. spiralis* reconocida a nivel mundial, cuyo resultado negativo obtenido a través de un procedimiento

validado, permite liberar carne y derivados sin cocción previa, para consumo humano (Gamble y col., 2000)

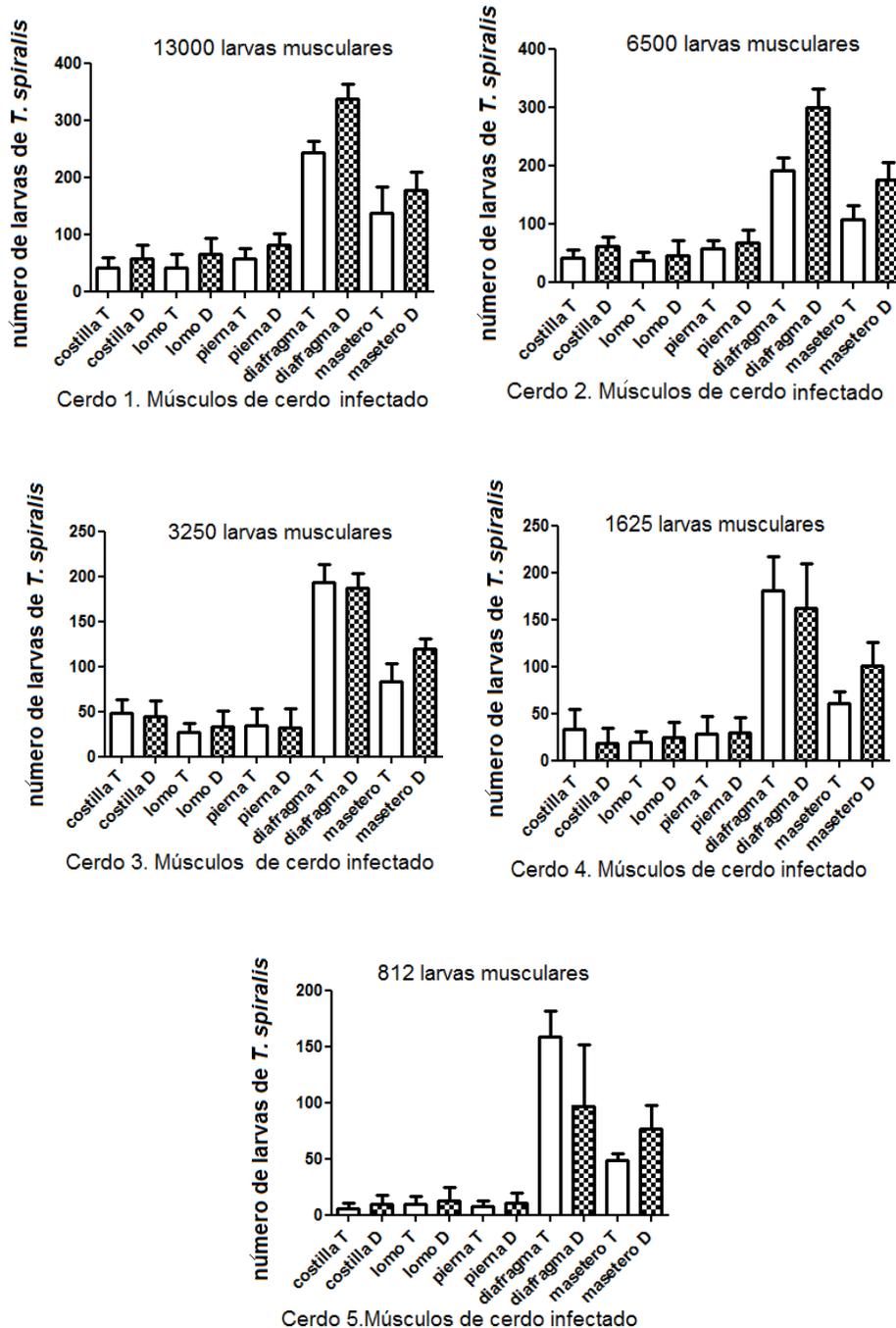


Figura 30. Número de larvas de diferentes tipos de músculos evaluados por digestión artificial (D) y triquinoscopia (T).

8.2.2. Discriminación de espectros de diafragma, macetero, lomo, pierna y costilla de cerdo control.

Después de aplicar los métodos tradicionales (triquinoscopia y digestión artificial) así como métodos inmunológicos como ELISA y Wester blot, se procedió a determinar espectros a los músculos de cerdo no infectados para lo cual se tomaron en cuenta las muestras de diafragma y macetero por ser músculos que se ocupan en los mataderos TIF para su inspección, además de costilla, pierna y lomo que son los músculos de mayor consumo comercial dentro de la población mexicana, estos músculos se molieron homogéneamente en un procesador de alimentos hasta formar una consistencia pastosa, se ocuparon 30 espectros de cada músculo control. Los cuales se analizaron e Interpretaron para desarrollar el modelo SIMCA (Figura 31).

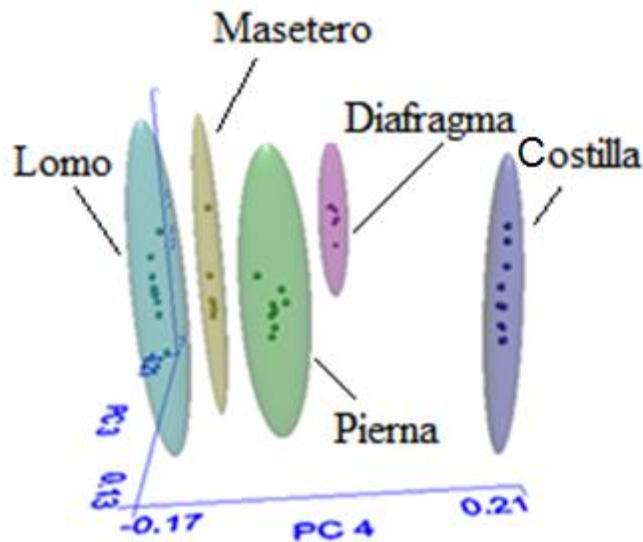


Figura 31. Distribución espacial de las poblaciones de músculos de cerdo control obtenidas con el modelo SIMCA optimizado.

El modelo desarrollado logró separarlos en grupos bien definidos sin traslaparse por tanto es capaz de discriminar diferentes poblaciones de músculos de cerdo control, como se muestra en la Tabla 9 donde la distancia inter-clase es muy buena entre cada una de la muestras de músculos de carne de cerdo control.

8.2.3. Diferenciación de espectros IR de diafragma, macetero, lomo, pierna y costilla de cerdos infectados con larvas de *Trichinella spiralis* por el modelo SIMCA

Lo siguiente fue alimentar al programa estadístico SIMCA con 30 muestras previamente obtenidas por triplicado de cada uno de los músculos de cerdo (diafragma, costilla, lomo, pierna, macetero) infectado experimentalmente (Figura 32).

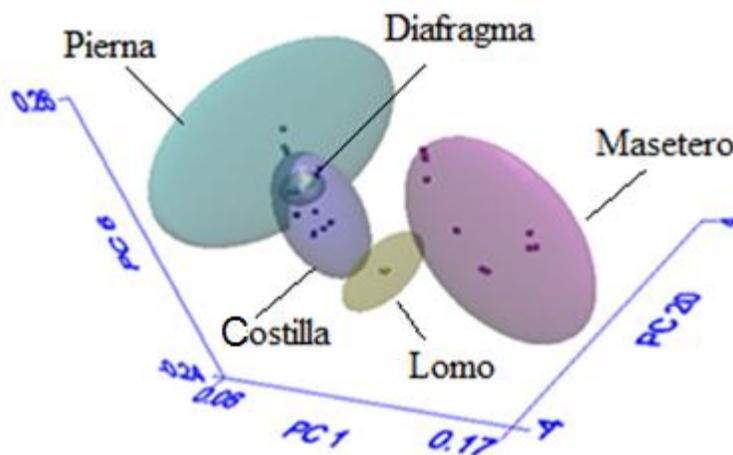


Figura 32. Modelo tridimensional SIMCA de carne de cerdo infectado experimentalmente (Análisis de componentes).

La Tabla 9 presenta la distancia entre las clases (ID) para los distintos tipos de músculo (infectados y no infectados). Se puede observar en esta Tabla que la carne infectada presenta menores valores de ID entre los tipos de músculos de cerdo (17.6 a 30.6) en comparación con las muestras infectadas (9.9-17.5).

La presencia del parásito es evidente por la reducción de las distancias entre clases entre los músculos. Esta reducción de la distancia entre las clases tal vez es debido a la presencia de carbohidratos de bajo peso molecular como es la trehalosa y tivelosa que se han asociado a la presencia del parásito como una respuesta inmunológica (Goyal et al. 2002).

Tabla 9. Distancia inter-clase de diferentes tipos de músculos de cerdo infectados y no infectados con *T. spiralis*.

	Pierna	Costilla	Masetero	Diafragma	Lomo
no infectados					
Pierna		20.6	19.3	24.7	18.2
Costilla			24.5	26.4	30.6
Masetero				21.4	17.6
Diafragma					26.9
infectados					
	Pierna	Costilla	Masetero	Diafragma	Lomo
Pierna		13.2	17.5	13.4	15.8
Costilla			14.7	11.2	10.6
Masetero				15.4	9.9
Diafragma					13.3

En lo correspondiente a la tasa de reconocimiento (también conocida como la sensibilidad) que representa el porcentaje de los espectros de la categoría que se analiza que son correctamente identificados por el modelo matemático, mientras que la tasa de rechazo (también conocida como la especificidad) representa el porcentaje de los espectros de extraños que no pertenecen a la categoría que se está analizando. Cuanto mayor es el reconocimiento de las tasas mejor es el método.

La Tabla 10 muestra las tasas de reconocimiento y rechazo de todas las muestras (infectados y no infectados). Como se puede ver para todos los tipos de músculos, tanto infectados y no infectados, los porcentajes de reconocimiento y rechazo de las 30 muestras utilizadas como validación externa fue del 100% (30 de 30). Estos resultados demuestran la capacidad de SIMCA a distinguir entre el los diferentes tipos de músculos diferentes y la presencia o no de larvas (infectados o no infectados con *T. spiralis*).

Tabla 10. Porcentaje de reconocimiento y de rechazo de las muestras (infectadas y no infectadas).

Clase	Reconocimiento (%)	Rechazo (%)
No infectado		
Pierna	100 (30/30)	100(120/120)
Costilla	100 (30/30)	100(120/120)
Lomo	100 (30/30)	100(120/120)
Masetero	100(30/30)	100(120/120)
Diafragma	100 (30/30)	100(120/120)
Infectado		
Pierna	100 (30/30)	100(120/120)
Costilla	100 (30/30)	100(120/120)
Lomo	100 (30/30)	100(120/120)
Masetero	100 (30/30)	100(120/120)
Diafragma	100 (30/30)	100(120/120)

8.2.4. Interpretación de los espectros FTIR/HATR de músculos de cerdo infectado y no infectado con *T. spiralis*.

La Figura 33 muestra los espectros de FTIR-HATR de las muestras carne de cerdo infectado y no infectado con larvas de *T. spiralis* (diafragma, macetero, costilla, pierna, y lomo) todas evaluadas en la región de $1700-900\text{ cm}^{-1}$, donde se aprecian las principales diferencias entre los valores de los picos de los espectros de músculos de cerdo control con respecto a los demás.

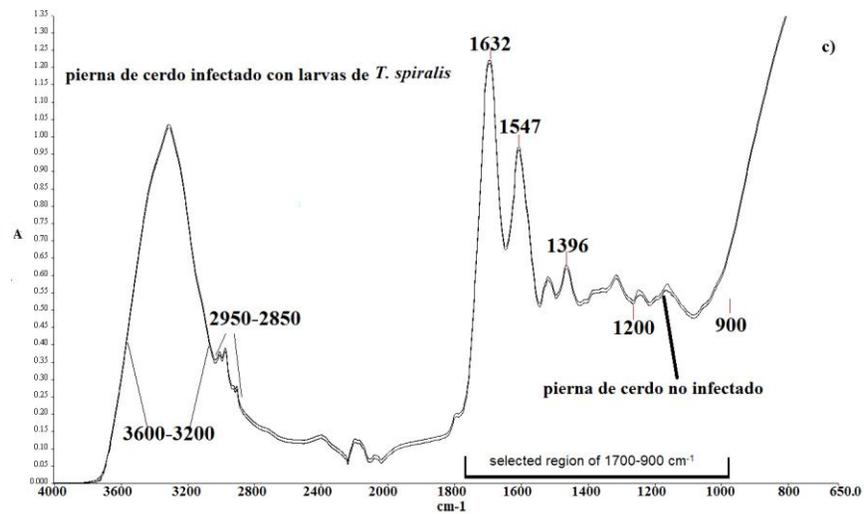
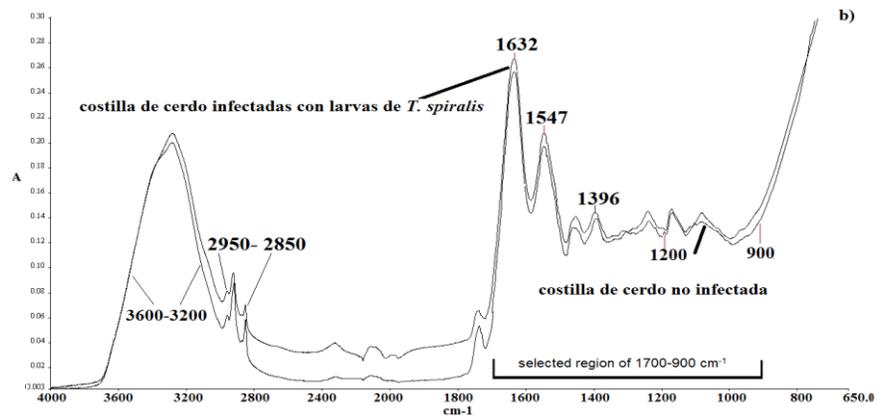
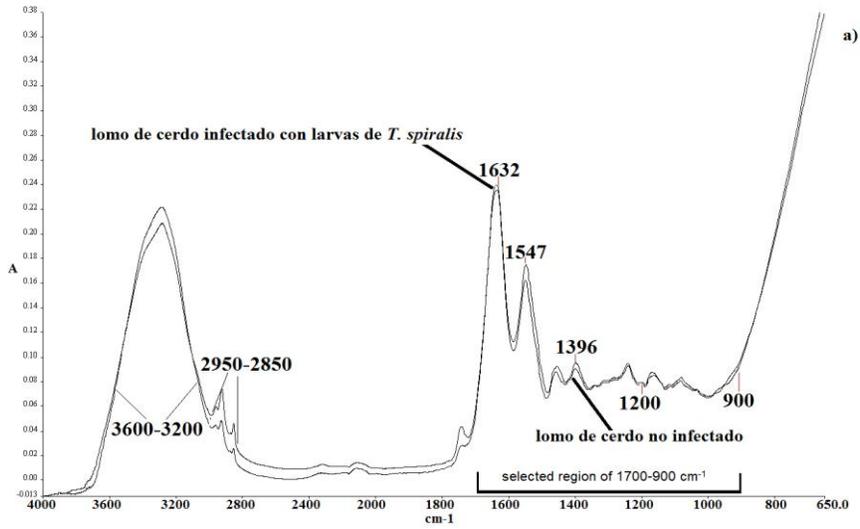
Los espectros FTIR-ATR de los músculos (Figura 33) muestran picos que dependen de los enlaces moleculares y los grupos funcionales que están presentes en la muestra, por lo tanto todos los músculos tienen una "huella digital" en función de su composición química. En la Figura 34 (a-e) se muestran los espectros infrarrojo medio de músculos de cerdo infectadas y no infectadas

(costilla, lomo, pierna, masetero y el diafragma, respectivamente) en el rango de 4000-900 cm^{-1} .

Todos los espectros muestran bandas características de la presencia de proteínas, ácidos grasos y el glucógeno. Las bandas de infrarrojo medio fueron asignados de acuerdo a los informes descritos en la literatura (Meza et al. 2011). La primera banda (3600-3200 cm^{-1}) se debe a la presencia de la vibración de grupos OH de agua, los dos picos a 2950-2850 cm^{-1} corresponden a enlaces CH con estiramiento de los grupos metilo y metileno. La pequeña banda a 1740 cm^{-1} se puede atribuir a la presencia de grupos funcionales de triglicéridos (C = O).

En la región seleccionada 1700-900 cm^{-1} para el análisis SIMCA, se pueden observar las bandas características de proteínas amida I (1632 cm^{-1} , C=O) y de amida II (1547 cm^{-1} (NH flexión se mezcla con el estiramiento CN) . La pequeña banda en 1396 cm^{-1} se debe a COO - las vibraciones de estiramiento de los ácidos grasos y proteínas. Por último, los grupos pequeños en la región de 1200-900 cm^{-1} se atribuyen a los hidratos de carbono tales como glucógeno.

Para reforzar los picos se aplicó la primera derivada a los espectros originales (100 espectros de cada músculo infectado y no infectado con *T. spiralis*) para amplificar pequeñas diferencias entre los espectros de carne de cerdo infectado y no infectado con *T. spiralis* sometido al análisis SIMCA. Este tratamiento se reflejó en una mejor diferenciación en la zona de la huella digital cuya región estudiada fue de 1700 a 900 cm^{-1} para la elaboración del modelo SIMCA.



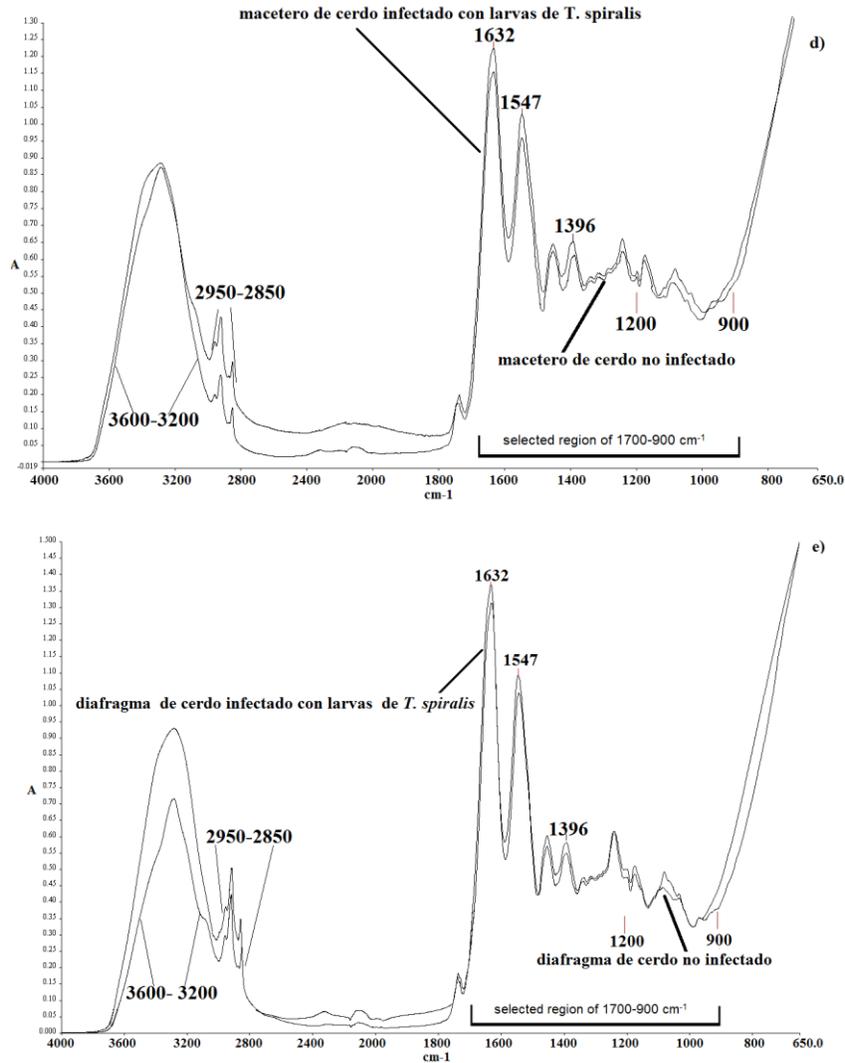


Figura 33 FTIR-HATR espectros de los diferentes músculos de cerdos infectados y no infectados con *T. spiralis*. a) costilla, b) lomo, c) pierna, d) macetero, e) diafragma.

8.2.5. Discriminación de espectros de diafragma, macetero, lomo, pierna y costilla de cerdo infectado y no infectados con *Trichinella spiralis* por el modelo quimiométrico SIMCA

Los músculos ya establecidos (masetero, diafragma, lomo, pierna, costilla infectados y no infectados) se molieron homogéneamente hasta formar una consistencia pastosa, se tomaron 100 espectros de cada músculo infectado y no infectado. Los cuales se analizaron e Interpretaron para desarrollar el modelo

SIMCA (Figura34-35) En los modelos tridimensionales se observó una excelente separación entre los músculos de cerdo infectado y no infectado con *Trichinella spiralis*.

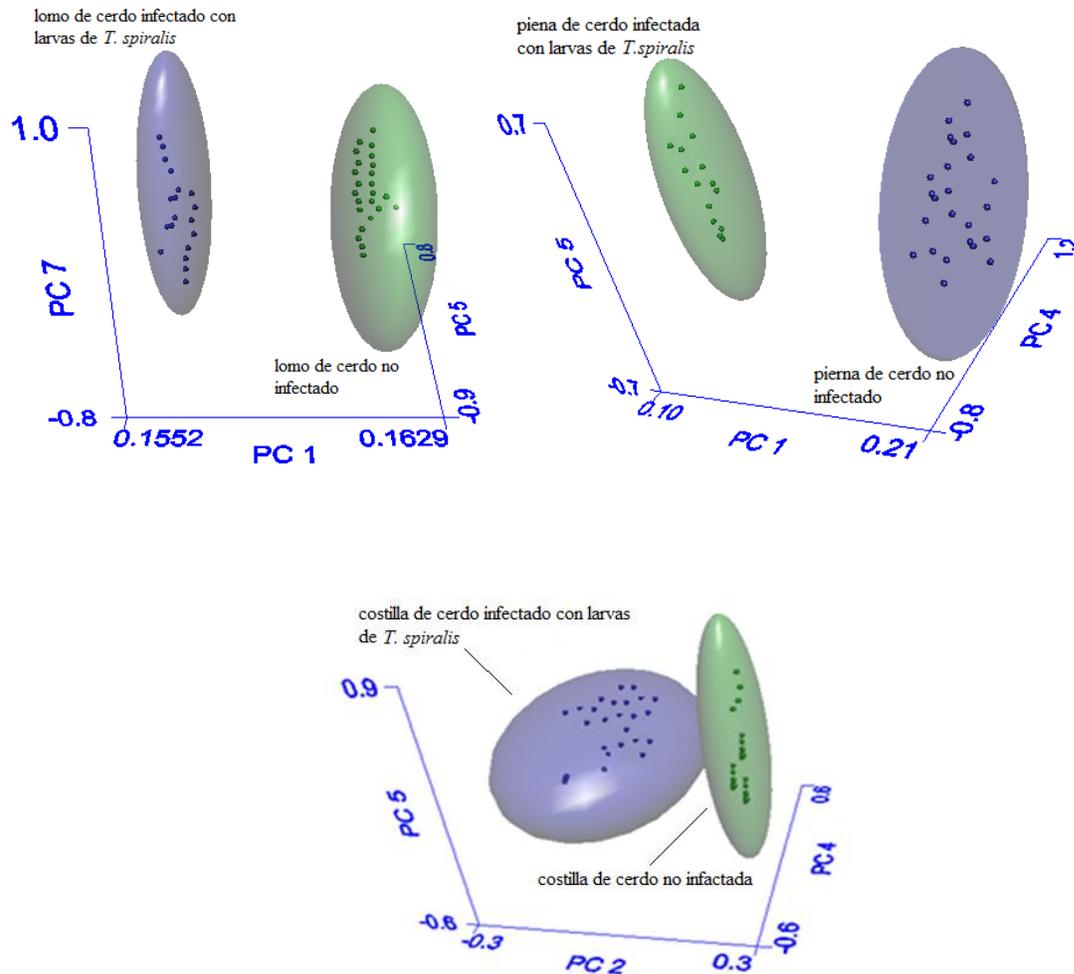


Figura 34. Análisis tridimensional de componentes principales de músculos de cerdo (costilla, pierna y lomo) infectado con *T. spiralis* y no infectado.

En todos los modelos la carne de cerdo control y de carne de cerdo (diafragma, costilla, pierna, macetero y lomo) infectado con *T. spiralis* se observó una buena separación entre ellas. El límite alrededor de cada grupo representa el 99% intervalo de confianza; cada punto de datos en el cluster representa un espectro de carne de cerdo control y carne de cerdo infectado con *Trichinella spiralis*.

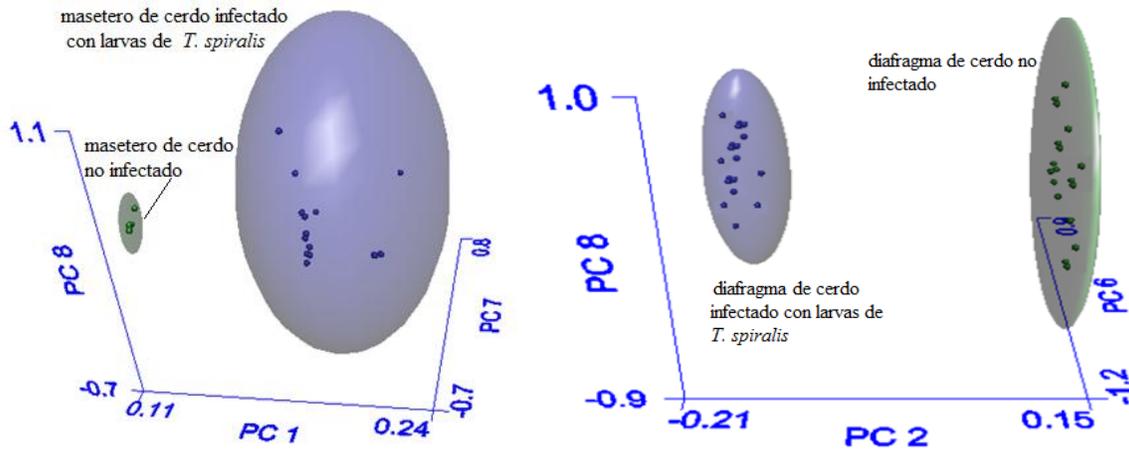


Figura 35. Análisis tridimensional de componentes principales de músculos de cerdo (diafragma y macetero) infectado con *T. spiralis* y no infectado.

En la Tabla 11 se muestran las distancias inter-clase de las poblaciones de músculos donde la distancia entre las cinco poblaciones es muy buena.

Los resultados indican que el músculo masetero muestra la mayor distancia entre las clases (36,8), mientras que el músculo de la costilla fue el de menor distancia (13,5), pero lejos del 3, el cual ha sido reportado por He et al. (2007) como la distancia mínima a considerar para una buena separación entre las clases. Esto muestra que el masetero puede ser considerado como el mejor músculo para la identificación del parásito. Sin embargo, el diafragma, pierna y lomo presentaron una buena distancia entre las clases (30,5, 23,3 y 22,6 respectivamente), por lo que también podrían ser considerados para fines de identificación del parásito.

También se observa en dicha Tabla que si la clase que se está analizando es la pierna infectada, 100 espectros pertenecen a esta clase, se identifican como pierna infectada, dado el 100% de reconocimiento (100 de 100). Además de 100 espectros pertenecientes a la clase de la pierna no infectados y por lo tanto, se rechazó el 100% (100 de 100). Lo mismo sucede con las otras clases (lomo infectados y no infectados, costilla, masetero, y el diafragma).

Tabla 11 Distancia Inter-clase y porcentaje de reconocimiento y de rechazo de las muestras infectadas y no infectadas con *T. spiralis*.

Clase	DI	Reconocido (%)	rechazado (%)
Pierna infectada	23.3	100 (100/100)	100 (100/100)
Pierna no infectada			
Lomo infectado	22.6	100 (100/100)	100 (100/100)
Lomo no infectado			
Costilla infectada	13.5	100 (100/100)	100 (100/100)
Costilla no infectada			
Masetero infectado	36.8	100(100/100)	100 (100/100)
Masetero no infectado			
Diafragma infectado	30.5	100(100/100)	100 (100/100)
Diafragma no infectado			

DI: Distancia inter-clase.

Con anterioridad se mencionó que en México, la determinación de *Trichinella spiralis* se lleva a cabo de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-194-SSA1-2004 la cual describe a la triquinoscopía y la digestión artificial como únicos métodos para establecer la presencia directa de larvas de *T. spiralis* en los tejidos.

Dichas técnicas establecidas en la norma mexicana cumplen con en los códigos sanitarios internacionales de la Comunidad Europea para la exportación de carne de porcino Reglamento (CE) n ° 2075/2005 la cual establece las normas específicas así como los controles oficiales de triquinas en la carne.

Estas metodologías de diagnóstico han resultado un tanto cuestionables de acuerdo a sus parámetros de especificidad. En este contexto, Ruitenbergh y Kampelmacher (1970) consideran que la digestión artificial es por lo menos tres veces más sensible que triquinoscopía, mientras que Knappen y colaboradores (1980) establecieron que a partir de cerdos infectados con dosis de 500 a 1500 larvas, sólo entre 10% y el 20% dieron positivo por triquinoscopía en comparación con alrededor del 50% en artificial digestión y Acha y Szyfres (1989) concluyeron que el método de digestión artificial tiene una sensibilidad mayor debido a que el tamaño de las muestras que normalmente se analizan son de 50 a 100 veces más

pesados que los procesados por triquinoscopía; por otro lado, Soulé y Dupouy (1991) consideraron que la triquinoscopía es menos sensible que la digestión artificial mientras que Capo y Despomier 1996 concluyeron que son ambos métodos son semejantes en su porcentaje de determinación aunque si no se tiene la experiencia necesaria se tiene el riesgo de confundir el gusano con fragmentos de tejido muscular al hacer la triquinoscopía.

Otros autores incluso no recomiendan la triquinoscopía como examen de rutina en los alimentos de origen animal que van a ser destinados a consumo humano (Gamble y col., 2000) no obstante, la posibilidad de llevarla a cabo en zonas donde no existen laboratorios que hagan el diagnóstico por digestión enzimática, es mucho mejor que no realizar ningún diagnóstico (Murrel, 2006).

Beck y colaboradores (2005) en un estudio en cerdos obtuvieron una sensibilidad y especificidad por triquinoscopía con muestras de 6 o menos larvas por gramo de 43.4% y de 88% por digestión artificial/g, comparándolo con los resultados que obtenidos por la espectroscopía infrarroja media por transformada de Fourier (MID-FTID) y el SIMCA con la cual se pudo determinar hasta 3 larvas/10g de tejido muscular con un intervalo de confianza del 99%.

Otros métodos para la identificación *T. spiralis* incluyen técnicas de detección de antígeno por inmunoensayo, como ensayo inmunoenzimático ELISA, que se basa en el uso de un conjugado (antígeno-anticuerpo) vinculados a una enzima de tal forma que el producto resultante (conjugado en total) tiene una actividad inmunológica que permite la detección de un sustrato específico, por una reacción colorimétrica enzimática de acuerdo a nuestros resultados esta técnica es confiable ya que otros autores han reportado un especificidad y sensibilidad 99% del (Gottstein et al. 2009).

Las técnicas de Triquinoscopía, Digestión artificial y Elisa han resultado ser técnicas que consumen tiempo, son laboriosos y requieren de profesionales altamente experimentados y bien entrenados.



De los resultados presentados se puede concluir que la aplicación de la MID-FTIR-ATR-SIMCA en la determinación de *Trichinella spiralis* en la carne de cerdo probó ser eficaz en su utilización para detectar la presencia del parásito, esto lo constata las distancias inter-clase entre cada músculos y carne infectada y no infectada todo con un 100 % en lo referente a las tasas de reconocimiento y de rechazo entre si.

9. Conclusiones.

- ✚ Mediante el uso de la FTIR-ATR y el modelo optimizado SIMCA en el modelo murino, se pudo detectar y clasificar correctamente la carne de rata control de carne de rata mezclada con larvas de *Trichinella spiralis*
- ✚ Se pudo determinar la presencia de *Trichinella spiralis* en carne de rata Incluso en concentraciones de tres larvas/10g del tejido muscular.
- ✚ Utilizando FTIR-ATR se pudo comprobar que no se obtuvieron falsos positivos con otros nematodos zoonóticos de importancia epidemiológica como *Ascaris lumbricoides* y *Taenia solium*. El modelo SIMCA pudo diferenciar parásitos entre si.
- ✚ Los resultados obtenidos en los cerdos infectados con larvas de *T. spiralis* mediante el análisis de varianzas de los métodos triquinoscopía y digestión artificial de los músculos, indicó que no hay diferencia significativa entre los dos métodos de diagnóstico. La comparación múltiple corrobora lo obtenido por el análisis de varianzas con un nivel de confianza del 99.82%.
- ✚ El análisis de varianza de los músculos seleccionados indicó que no hay diferencia significativa entre Costilla, Lomo y Pierna, (subgrupo 1) pero si existe entre diferencia significativa entre el subgrupo 1 y el subgrupo 2 constituido por diafragma y macetero, al hacer las comparaciones múltiples de TUKEY con un nivel de confianza del 99.33%.
- ✚ Se pudo determinar que se deben de tomar las muestras para detectar *Trichinella spiralis* por triquinoscopía y digestión artificial, en los diafragmas y maceteros de los cerdos pues hay una mayor acumulación de parásitos en estos músculos.

- ✚ Mediante el uso de la FTIR-ATR y el modelo optimizado SIMCA, se pudo detectar y clasificar correctamente la carne de cerdo infectada experimentalmente y carne de cerdo control (no infectado). En lo referente a la distancia inter-clase el modelo SIMCA en carne de cerdo arroja resultados excelentes de los músculos analizados ya que tienen una distancia mayor a 3 como lo marca la literatura, por lo cual se considera que las dos poblaciones analizadas son independientes estadísticamente.
- ✚ El modelo SIMCA optimizado entre muestras de cerdo infectado con *T. spiralis*. de muestras de cerdo control (no infectado) fue de cien por ciento, resultando confiable para la identificación y discriminación.
- ✚ Se observaron diferencias significativas entre músculos (diafragma, macetero lomo, pierna y costilla) por lo que se recomienda emplear el modelo SIMCA para cada músculo.
- ✚
- ✚ En el análisis se observó que el músculo masetero puede ser considerado como el mejor para MID-FTIR-ATR-SIMCA con fines de identificación de parásitos, esto debido a su mayor distancia interclase con respecto a los otros músculos. Sin embargo, el diafragma, pierna y lomo presentaron una buena distancia inter-clase y por lo tanto también podrían ser considerados para fines de identificación del parásito.
- ✚ Los resultados obtenidos en el análisis de varianza por los métodos de digestión artificial y triquinoscopía dan indicios de proponer este método para determinar *T. spiralis* en carne de cerdo, así como para otros tipos de carnes de importancia comercial que se vean afectados con la infección de dicho parásito, sobre todo si se compara esta metodología con los métodos convencionales, donde las principales ventajas de MID-FTIR-HATR-SIMCA



son que requiere un volumen de muestra pequeño, no daña el medio ambiente debido al hecho de que la preparación mínima de la muestra no se requiere de solventes , además de su capacidad en la rapidez de la determinación (aproximadamente 5 minutos en comparación con aproximadamente 30 minutos en la triquinoscopia y $3 \frac{1}{2}$ h para la digestión artificial).

10. BIBLIOGRAFÍA

Acha P. N., Szyfres B. 1989. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica N°503 OPS, Washington (EUA), 865-879.

Alexandrakis D., Downey G., Scannel A.G.M. 2008. Detection and identification of bacteria in a isolated system with infrared spectroscopy and multivariate analysis. J. Agric. Food Chem. 56, 3431-3437.

Alcántara P., Gorodezky C., Correa D., Martínez-Marañón R., Magos C. and Olivo A., 1989. Diagnosis of human trichinosis by the enzyme-linked immunosorbent assay. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 30, 227-230.

Al-Jowder, O. Kemsley, E.K., Wilson, R.H. 1997. Mid-infrared spectroscopy and authenticity problems in selected meats: a feasibility study. Food Chem. 59, 195-201.

Ancelle T. 1998. History of triquinelosis outbreaks linked to horse meat consumption, 1975-1998. EuroSurveillance. 3 (8), 86 -89.

Andiva, S., H. Yera, S. Haeghebaert, C. Tourte-Schaefer, J. F. Magnaval, and J. Dupouy-Camet. 2002. Comparative evaluation of a latex agglutination test, two ELISA tests and a Western blot test for the serodiagnosis of human trichinellosis. Ann. Biol. Clin. (60)79-83.

Arriaga C , Muñoz, E; Morilla, A , Ortega-P, G. 1989 .*Trichinella spiralis*: Recognition of muscle larva antigens during experimental infection of swine and its potential use in diagnosis. Exp. Parasitol. 69 (4), 363-372.

Arriaga C. Yépez L. Ortega P. 1996 Actualidades sobre la Triquinelosis equina Rev Lat-Amer. Microbiol. 38 (2), 139-150.

Armenta, G, S., Quintás, S, G., & de la Guardia M. 2005 Mid-infrared and Raman spectrometry for quality control of pesticide formulations. Trends Anal. Chem. (24) 772-781.

Arvanitoyannis, I.S.; Tsitsika, E.V. & Panagiotaki, P. 2005. Implementation of quality control methods (physicochemical, microbiological and sensory) in conjunction with multivariate analysis towards fish authenticity. International Journal of Food Science and Beebe, K.R.; Pell, J.L. & Seasholtz, M.B. (1998). Chemometrics: A practical guide. Wiley Interscience Publication. New York, USA. Technology, (40) 237 – 263.

Beebe, K.R.; Pell, J.L. & Seasholtz, M.B. 1998. Chemometrics: A practical guide. Wiley Interscience Publication. New York, USA.

Beck, A., Gasparc, Z., Mihaljević, A., Marinculica, D. S., & Brstiloc, M. (2005) Evaluation of ELISA for detection of *Trichinella* antibodies in muscle juice samples of naturally infected pigs. *Vet. Parasitol*, (132) 91-95.

Berumen V. Muñoz J. Moreno M. 2002 Triquinelosis en perros callejeros de la ciudad de Zacatecas México. *Parasitol Latin*. (57) 72 -74.

Bruschi F. Murrell O. 2002 .New aspects of human triquinelosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad Med J*. (78), 15-22.

Büning-Pfaue, H. & Kehraus, S. (2000). Application of near infrared spectroscopy (NIRS) to the analysis of frying fats. 3rd. International Symposium on Deep Fat Frying.

Caballero G. ML, Jimenez C. E. 2001. Early detection of *Trichinella spiralis* infection by the polymerase chain reaction in blood samples of experimentally infected mice. *Parasite*, (8) 229-31.

Calcagno, Marcela A., Teixeira, Cármen, Forastiero, María A. 2005. Aspectos clínicos, serológicos y parasitológicos de un brote de triquinelosis humana en Villa Mercedes, San Luis, Argentina: Las fases aguda y crónica de la infección. *Medicina (B. Aires)* (65), (4) 302-306.

Capo, V. and Despommier D.D. 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, (9), 47-54.

Che Man, Y B., Syahariza Z.A. Mirighani, M.E.S. Jinap, S and Bakar, J 2005. Analysis of potential lard adulteration in chocolate and chocolate products using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Chem* 90:815-819.

Cox G. 2002. History of Human Parasitology. *Clin Microbiol Rev*. 15(4) 595-612.

De la Rosa J. L., Correa D. (1996). Longitudinal analysis of the humoral immune response of rats experimentally infected with *Trichinella spiralis* by western blot. In: Ortega-Pierres G, Gamble H R, van-Knapen F, Wakelin D, editors. *Proceedings of the Ninth International Conference on Trichinellosis*. Mexico City, Mexico: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, 333–337.

De la Rosa J.L., Aranda J.G., Padilla E. y Correa D., (1998). Prevalence and risk factors associated with serum antibodies against on *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol*. 8: 317.

Defernez, M., Kemsley K. E. and Wilson, R. H. 1995. Use of infrared spectroscopy and chemometrics for the authentication of fruit purees. *J. Agricult. Food Chem*, 1, 109-113.

De Maesschalck, R., Candolfi, A., Massart, D. L., & Heureding, S. (1999). Decision criteria for soft independent modeling of class analogy applied to infrared data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 47, 68-77.

Despomier D. "*Trichinella spiralis*" Apple Trees Productions., New York, 2004.

Doxey, L. D. 1987. Patología clínica y procedimientos de diagnóstico en veterinaria. Ed. Manual Moderno. pp. 284-297.

Dupouy C.J. 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet. Parasitol.* 93, 14, 191-200.

Downey G., Briandet R., Wilson R. H. and Kemsley K. E. 1997. Near- Mid-infrared spectroscopies in food authentication: coffee varietal identification. *J. Agricult Food Chem*, 45, 4357-4361.

Dordevic, M. 1991. Detection of *Trichinella* by various methods in Yugoslavia. *Southeast Asian. J. Trop Med Public Health.* 22,326–328.

Dzbencki, T. D., Bitkowski, E., & Plonka, W. 1994. Detection of circulating antigen in acute infections with *Trichinella spiralis*: diagnostic significance of findings. *Zentralbl Bakteriol*, 281, 519–525.

Edelmann, A., Diewock, J., Schuster, K. C. and Lendl, B. (2001). Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *J.Trop Med Public Health.* 49, 1139-1145.

Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., & Shmulevich, I. (2004) Determination of protein concentration in raw milk by mid-infrared Fourier transform infrared/attenuated total reflectance spectroscopy. *J. Dairy Sci.*87, 2779–2788.

Forbes, L. B., & Gajadhara, A. A. 1999. A validated *Trichinella* digestion assay and an associated sampling and quality assurance system for use in testing pork and horse meat. *J. Food Prot.* 62, 1308-1313.

Fox, M.A & Whitesell, J.K. 2000. Química orgánica. Addison Wesley Longman. México.

Gallardo, V. T., Osorio, R. G., Cárdenas B F., Beltrán O. M.(2008). Determination of ternary solutions concentration in liquid-liquid extraction by

the use of attenuated total reflectance- Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate data analysis J. Chem. Eng.86,77-83.

Gallardo, V. T., Osorio, R. G., Zúñiga, L. M., Rivera, E.Y. (2009). Application of FTIR-HATR and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. Food Res. Int., 42, 313-318.

Gamble, H.R. (1996). Detection of Trichinellosis in Pigs by Artificial Digestion and Enzyme Immunoassay. J. Food Protect.59(3), 295-298.

Gamble HR. 1997. Parasites associated with pork and porks products. Rev Sci Tech Off int Epiz; 16: 496-506.

Gamble, R. H., Bessonov, S. A., Cuperlovic, K., Gajadhar, A., van Knapen, F., Noeckler, K., Schenone, H., Zhu, X. 2000. International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. Vet. Parasitol. 93: 393-408.

Gajadhara, A. A, Gamble, H.R. 2000. Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. Vet Parasitol. 93, 183-189.

Gajadhara A, Pozio E., Gamble R, Karsten Nöcklerd, Maddox,H.C, Forbes B. L, Valléef, I, Rossib, P, Marinculićg, A, Boireauf, P.2009. *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. Vet. Parasitol. 159, 197-205.

Gottstein, B., Pozio, E., & Nöckler, K. 2009. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. Clin. Microbiol. Rev. 1 (22), 127-145.

Goyal, P.,Wheatcroft, J., Wakelin, D.2002. Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*. Parasitol.Int. 51(1):91-8.

Hassan, E., Faragal, M., Moghazy, El., & Nagwa, I. T. (2010). Comparison of Two Antigens for Diagnosis of Trichinellosis in Pigs. W. J. Sci Appl , 8(4), 457-461.

He, J., Rodríguez, S. L., Giusti, M. M. 2007. Mid infrared spectroscopy for juice authentication-rapid differentiation of commercial juices. J. Agr. Food Chem. 55(11), 4443-4452.

Hernández, M. M., Gallardo, V. T., Osorio, R. G. (2010) Rapid characterization and identification of fatty acids in margarines using horizontal attenuate total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy(HATR-FTIR). Eur. Food Res. Tech. 231, 321-329.

Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D., Cliver, D.O. 2000. Food borne Disease Handbook Vol 1: Bacterial Pathogens. Vol 2: Diseases Caused by Viruses, Parasites and Fungi. Vol 3: Diseases Caused by Hazardous. Marcel Dekker .

Infometrix, Inc. (1996). Chemometrics in food and beverage. Chemometrics Applications Overview. <http://www.infometrix.com>

Jiménez E, Caballero M., Uribe, G.Trejo E.Gay R. 2005. Frecuencia de *Trichinella Spiralis* en sangre y músculos de equinos sacrificados en dos diferentes mataderos, uno de tipo industrial y otro de tipo rural en el estado de México, México Vet. Méx. 36(3), 269-278.

Kapel M.O. 2000. Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. Vet. Parasitol. 93: 263-278.

Kociecka W. 2001. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. Vet Parasitol. 93:365-83.

Kohler G, Pfeiffer G. Zur 1983. Möglichkeitweiter Verkürzung des direkten Trichinellen nachweises beim schlachtschwein. Fleischwirtschaft. 63: 330-333.

Kilgore M.W., Stewart G.L, Lou M. 1986. Chemical composition of new borne larvae , muscle larvae and adult *Trichinella spiralis*. Int. J. Parasitol 16:455

Luna Sánchez / Sergio H. Sánchez Rodríguez .2006. TRIQUINELOSIS HUMANA .Archivos de Medicina, año/vol. 2, número 004 .Asociación Española de Médicos Internos Residentes Madrid, España.

Makedonka Mitreva, Douglas P. Jasmer. 2006 . Biology and genome of *Trichinella spiralis**, , Department of Molecular Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, .

Manual de Técnicas de Laboratorio InDRE 2007.

Marcos I., Perez J., Fernandez E., Garcia. And Moreno B. 2002. Detection of adulterants in olive oil by Headspace-Mass Spectrometry J. of Chromatography A. 945:281-286.

Mariela L ,.Ochoa, Peter B. Harrington. 2005. Chemometric Studies for the Characterization 3rd Differentiation of Microorganisms Using in Situ Derivatization and Thermal Desorption Ion Mobility Spectrometry Analytical. Chemistry. 3,854-863.

Marti, H.P., K.D. Murrell, H.R. Gamble. 1987. *Trichinella spiralis*: Immunization of pigs with newborn larval antigens. Exp. Parasitol. 63, 68-73.

Martínez. R. 1998. Situación de la triquinosis en Chile Escuela de Salud Pública en el Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud. <http://epi.minsal.cl/epi/html/public/triauinosis.htm>.

Mazzotti y Chavira C. Investigación de Triquina en 600 Diafragmas humanos en la Ciudad de México. 1943 Rev. Inst. Salubridad y Enf. Trop. 4(4) pp. 343-351.

Melgar Lalanne, María Guiomar. 2009. Desarrollo de un modelo quimiométrico acoplado a FTIR-HATR para la determinación de las principales propiedades químicas del queso Panela. Tesis de Maestría- Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN.

Medina-Lerena, M, S., A, Ramirez-Álvarez., M, Kühne., A, Gómez-Priego, and J, L, de-la Rosa. 2009. Influence of different processing procedures on the reproductive capacity of *Trichinella spiralis* in pork meat. Trop. Anim. Health Pro. 41,(4)437-442 .

Meza, M, O., Gallardo, V, T., & Osorio, R, G. 2010. Application of mid-infrared spectroscopy with multivariate analysis and soft independent modeling of class analogies (SIMCA) for the detection of adulterants in minced beef. Meat Science, 86, 2010, 511-519.

Meza, M. O., Gallardo, V. T., Dorantes, A. L., Osorio, R. G., De la Rosa, J. 2011. FT-MIR and Raman spectroscopy coupled to multivariate analysis for the detection of clenbuterol in murine model. Analyst 136, 3355-3365.

Mikkonen, T. L., Oivanen, A., Näreaho, H., Helin & Sukura, A. 2001. Predilection Muscles and Physical Condition of Raccoon Dogs (*Nyctereutes procyonoides*) Experimentally Infected with *Trichinella spiralis* and *Trichinella* native. Acta veterinaria Scandinavica, 42, 441-452.

Mizaikoff, B., B. Lendl. (2002). Handbook of Vibrational Spectroscopy, J.M. Chalmers and P.R. Griffiths (Eds), John Wiley & Sons, Ltd, 2, 1560-1573.

Moller, L. N., Petersen, E., Gamble, C., Kapel O. 2005. Comparison of two antigens for demonstration of *Trichinella spp.* antibodies in blood and muscle fluid of foxes, pigs and wild boars. Vet. Parasitol. 132, (1), 81-84.

Moorhead A. Grunenwald P. Dietz V.Schantz P. 1999.Triquinelosis in the United States, 1991-1996: declining but not gone. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene Am. J. Trop. Med. Hyg. 60(1) pp. 66-69.

Murrell K. D.,Lichtenfels R.J.,Zarlenga D.S.,Pozio E. 2000.The systematics of the genus *trichinella* with a key to species Vet. Parasitol.93:293-307.

Murrell, K.D. and Pozio, E. (2000). Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. Int. J. Parasitol. 30(12-13):1339-1349.

Mongay, C. 2005. Quimiometría. Universidad de Valencia. España.

Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO -1999 Especificación técnica para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004.Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto almacenamiento, transporte y expedición.

Nöckler, K., Pozio, E., Voigt, P., & Heidrich, J. (2000). Detection of *Trichinella* infection in food animals. Vet. Parasitol. 93, 335-350.

Nöckler, K., Reckinger S., Broglia, A., Mayer-Scholl, A., Bahn, P. (2009). Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti *Trichinella*-IgG in pig sera. Veterinary Parasitology. 163, 341–347.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ,2000 Sistema de Calidad e Inocuidad de los alimentos.

Ortega-Pierres, M. G., Arriaga, C., Yépez- Mulia, L 2000. Epydemiology of X triquinelosis in Mexico, Central and South America. Veterinary Parasitology. 93: 201-225.

Osborne B. F.and Hilde P. 1993. Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis,Logman Sientific y Technical,2nd ed.Harlow,England.

Otto, M. 1999. Chemometrics: Statistics and computer application in analytical chemistry. Wiley VCH. Germany.

Paradkar, M.M. and Irudayaraj,J 2002.Determination of cholesterol in dairy products using Infrered techniques:1 Spectroscopy.international J. Dairy Technol. 55(3): 127-132.

Paradkar, M.M. and Irudayaraj, J. 2002b. Rapid determination of caffeine in soft drink using FTIR-ATR Spectroscopy. *Food Chem* 78:261-266.

Park S.C., Lee S.J., Namkung H., Chung H., Han S.H., Yoon M.Y., Park J.J., Lee H.H., Oh C.H., Woo Y. Y.A. 2007. Feasibility study for diagnosis of stomach adenoma and cancer using IR spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* 44, 279-285.

Pawlowski, Z. S. (1983). Clinical aspects in man, In W. C. Campbell (ed.), *Trichinella* and trichinosis, Plenum Press, New York. 367– 402.

Patz, C. D.; Blieke, A.; Ristow, R. & Dietrich, H. (2004). Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analy. Chim. Acta.* 513: 81-89.

Pérez D.P., Sanchez M.T., Cano G. and Garrido. A. 2001. Authentication of green asparagus varieties by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Food Science*, 64, 323-327.

Pérez E. Serrano F Reina D.Mora. Navarrete. 2000. Sylvatic triquinelosis in southwestern Spain. *Journal of Wildlife Diseases.* 36(3) pp. 531-53.

Perkin-Elmer de México, SA. 2005. Tutorial de ASSURE ID. Curso básico. Perkin Elmer LLC. Reino Unido.

Perkin Elmer de México S.A. (2008). Espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier. Curso Básico.

Pozio E. La Rosa G. 1998. Short report: Identification of the likely etiologic agent of human triquinelosis in Sicily (Italy) between 1933 and 1946. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(6) pp. 906-907 33.

Pozio E. 1998 Human outbreak of triquinelosis associated with the consumption of horsemeat in Italy. *EuroSurveillance.* 3(8/9) p 85-86.

Pozio E. Factors affecting the flor among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. 2000. *Veterinary Parasitology.* 93: 241-262.

Pozio, E. (2001). New patterns of *Trichinella* infection. *Vet. Parasitol.* 98, 133–148.

Pozio, E.; Sofronic Milosavljevic, L.; Morales, M.A.G.; Boireau, P; Nockler, K. 2002. Evaluation of ELISA and Western Blot Analysis using three antigens to detect anti – *Trichinella* IgG in horses. *Veterinary Parasitology.* 108(2): 163-178.

Regulation the commission of the european communities No 2075/2005 of the commission of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for the presence of *Trichinella* in meat.

Ribicich, M., Gamble, H. R., Santillan, G., Miguez, M., Molina, V., Guarnera, E., Basso, N., Franco, A. (2000). Evaluation of ELISA test for the diagnosis of porcine trichinellosis. *The Pig Journal*, 46, 24-34.

Ribicich, M., Rosa, A., Bolpe, J., Scialfa, E., Cardillo, N., Pasqualetti, M.I., Betti, A., Fariña, F., Vizio, E., Gimenez, R., Pascual, G., Borrás, P., Aronowicz, T. avances en el estudio del diagnóstico y la prevención de la trichinellosis (2010) jornadas de la asociación argentina de parasitología veterinaria xix encuentro rioplatense de veterinarios endoparasitólogos.

Rodríguez E., Rodríguez M, Nieto J., Ubeirab F. Gárate T. 2004. Revisión de los brotes de triquinelosis detectados en España durante 1990-2001. *Enferm Infece Microbiol Clin*. 22(2) p 70-76.

Rodríguez-Saona, L.E.; Koca, N.; Harper, W.J. & Alvarez, V. B. 2006. Rapid Determination of Swiss Cheese Composition by Fourier Transform Infrared / Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. *J Dairy Sci*. 89: 1407- 1412.

Ruitenber E.J, Kampelmacher E. H. Diagnostische Methoden zur Feststellung der Invasion mit *Trichinella spiralis*. *Fleischwirtschaft* 1970; 50: 42-44.

Sablani, S., Datta, A. K., Rahman, M. S. y Mujumdar, A. S. 2007. Handbook of food and bioprocess Modeling Techniques. Estados Unidos.

Sánchez-Rodríguez*, Berenice Luna Sánchez. 2006. Triquinelosis: modelo de estudio y técnicas de diagnóstico clínico. *Arch. Med*.

SENASICA 2011. Manual de buenas practicas de producción en granjas porcina.

Soulé C, Dupouy Camet J. La Trichinellose: une zoonose en évolution. OIE, París (Francia), 1991; p.292.

Stojcevic D, Zivicnjak T, Marinculic A, Marucci G, Andelko G, Brstilo M, Pavo, L, and Pozio E. 2004. The Epidemiological Investigation of *Trichinella* Infection in Brown Rats (*Rattus norvegicus*) and Domestic Pigs in Croatia Suggests That Rats are not a Reservoir at the Farm Level. *Journal of Parasitology*. 90: 3, 666-670.

Takahashi Y, Uno T et al . 1990.The intestinal gland of *Trichinella spiralis* with emphasis on morphology and antigenicity. Journal of Electron Microscope. 39, 39-45.

Tinoco-V, I.; Gómez-P, A; Mendoza, R.; de-la-Rosa, J.-L. 2002. Searching for antibodies against *Trichinella spiralis* in the sera of patients with fever of unknown cause. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Vol. 96,(4), pp. 391-395

Vacio T. M. Muñoz J. Saldivar S. Moreno M. 2003.Diagnóstico de Triquinelosis en Cerdo. Revista Virtual Visión Veterinaria; 2(11).

Van der Leek, M., Dame, J., Adams, C., Gillis, K., Littell, R. (1992). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of trichinellosis in swine, American Journal of Veterinary Research, 53 (6), 877-882.

Van Knappen F, Franchimont JH, Ruitenber EG, Baldelli B, Bradley J, Gibson TE, Gottal C, Henriksen Sa, Köhler G, Skovgaard N, Soulé C, Taylor SM. Comparison of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) with three other methods for the detection of *Trichinella spiralis* infections in pigs. Vet Parasitol 1980; 7:109-121.

Vignau M,L Eiras D.F, Risso M. A. 2003.Comparative analysis between Trichinoscopy and Artificial digestion, in experimental infections with low number of larvae. Analecta Veterinaria 2003; 23 (2): 24-27.

Vignau ML, Guardis MdelV, Risso MA, Eiras DF. 1997 Comparison between two methods for diagnosis of trichinellosis: trichinoscopy and artificial digestion. Mem Inst Oswaldo Cruz. 92: 585-587.

Viveros N. Arriaga C. Banda V. Ortega P. Yépez L. 2001 Detection of *Trichinella* infection in slaughter by artificial digestion, ELISA and PCR. Parasite 8 pp. s 257-s259.

Willard, H.H., Merritt, L. and Dean, J.A. (1991). Métodos instrumentales de análisis. Grupo editorial Iberoamericano S.A. de C.V. México.

Woon M. Han-Mo K .Dong-II C. Tae Y. 2000.The first human case of *Trichinella spiralis* infection in Korea. The Korean Journal of Parasitology 38 (2)pp. 111-115.

Yu C, Irudayaraj J. 2005. Spectroscopy characterization of microorganism by Fourier transform infrared microspectroscopy. Biopolymers. 77, 368-377.



Zarlenga, D.S. & La Rosa, G., (2000). Molecular and biochemical methods for parasite differentiation within de genus *Trichinella*. *Veterinary Parasitology*. 93: 279-292.

APÉNDICES I material

MATERIAL UTILIZADO EN EL EXPERIMENTO	
Agitador magnético	Procesador de carne
Algodón	Tubos Eppendorf
Aplicadores de madera	Viales de plástico
Balanza analítica	Vortex
Balanza granataria	MATERIAL DE VIDRIO
Bomba peristáltica	Agitador de Vidrio
Campana de flujo laminar	Matraz Erlenmeyer 100, 250, 500ml
Centrifuga clínica	Embudos de separación
Computadora	Pipetas graduadas 5, 10, 25ml
Congelador de -70°C	Probeta 10, 50, 100, 1000ml
Cubre bocas	Vaso de precipitados 50, 100, 250, 500, 1000ml
Cámara fría o refrigerador	Tubos de Ensayo 13 x 100
Congelador de -20°C	Pipetas Pasteur
Desinfectantes	Embudo
Equipo de Electrotransferencia	Cámara de Gases
Estuche de Disección	Cajas de Petri
Espátula	Matraz aforado 50, 100, 250, 1000 y 2000ml
Estufa cultivo	Mortero con pistilo (porcelana)
Estufa de 37 °C con corriente de CO ₂	Cubre objetos
Etiquetas adhesivas	Porta objetos
Fuente de poder	Triquinoscopio
Gasa	Termómetro
Guantes	Potenciómetro
Gradillas	Soporte universal
Hilo cáñamo	Tela adhesiva
Lavador de placas de Elisa automático	Refrigerador de 4°C
Jeringas de Insulina	SOLUCIONES
Jeringas de 3, 5 y 10ml	Solución amortiguadora de fosfatos 10x
Lector de ELISA, con filtro de 595 nm.	Albúmina Sérica Bovina (ASB) 1 mg/mL
Mechero Fisher	Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2
Membrana de celulosa spectrum de poro molecular de 6000 a 8000	PMSF
Micropipeta de 0.5 a 10 µL	TLCK 5X
Micropipeta de 5 a 40 µL	TPOCK 5X
Micropipeta de 50 a 200 µL	PHMB y PMSF
Micropipeta de 100 a 500 µL	Sustrato de W.B.
Micropipeta de 200 a 1000 µL	Hidróxido de Sodio 1 N
Micropipeta de 10 a 1000 µL	Pepsina al 1%
Micropipeta de 0.5 a 5 µL	HCl al 1%
Micropipeta multicanal de 8 canales de 50 a 200 µL	Etanol al 70%
Microscopio compuesto	Acilamida-Bisacrilamida 30%
Microscopio óptico	Tris-Base 2M pH 8.8
Parrilla de agitación magnética	SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 10%
Papel filtro Whatman no. 1, 2, 3, 4 y 40	APS (Persulfato de Sodio) al 10%
Pinzas	Solución de lavado (PBS Tween 0.05%)
Piseta	Solución bloqueadora de leche descremada al

Placas de ELISA de poliestireno de fondo plano 3590 Placas de 8 canales para W.B. Plumones de tinta indeleble Puntas para micropipetas de 2 a 200µL Puntas para micropipetas de 200 a 1000µL Tijeras	5% en PBS-Tween 20 al 0.05% Solución Amortiguadora de Carbonatos 0.1M pH 9.6
	Buffer Citrato-Fosfato 75 mM, pH 5.0
	Sustrato (<i>Triquinella</i>)
	Solución H₂SO₄ 2N
	Regulador de Transferencia Tris 0.025 M, Glicina 0.125 M, pH 8.3 Metanol al 20% v/v
	Rojo de Ponceau S al 0.2%

APÉNDICE II – Soluciones

Albúmina Sérica Bovina (ASB) 1 mg/ml	
Componentes	Cantidad y/o volumen
ASB	10 mg
H ₂ O	10 ml

- Se pesan 10mg de ASB y se disuelven en 5 ml de agua destilada.
- Se afora la solución en un matraz volumétrico a 10 ml.
- Se guarda en un frasco de vidrio a 4°C.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PB) 10x	
Componentes	Cantidad y/o volumen
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2.62 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	11.50 g
H ₂ O	1000 ml

- Se miden 800ml de agua destilada y se vacían en un vaso de precipitado.
- Se pesan 2.62g de NaH₂PO₄ ·H₂O (fosfato de sodio monobásico) se agrega al vaso de precipitados y se disuelve.
- Se pesan 11.5g de Na₂HPO₄ (fosfato de sodio dibásico anhidro), se adicionan al vaso de precipitados y se disuelve (ésta sal tarda en disolverse).
- Se afora a 1000ml con agua destilada.
- Se envasa en un frasco de plástico se etiqueta y guardar a 4°C.

Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS pH 7.2)	
Componentes	Cantidad y/o volumen
PB 10X	100 ml
NaCl	8.75 g
H ₂ O	900 ml

- Fosfatos 0.1M, salina 0.015M.
- En una probeta medir 100ml de PB 10X y vaciarlo en un vaso de precipitado.
- En la misma probeta medir 900ml de agua destilada, agregarla al vaso de precipitado que contiene PB 10X y mezclar.
- Agregar 8.75g de NaCl (cloruro de sodio) y disolver.
- Se ajusta el pH de la solución a 7.2 con HCl 1N o con NaOH 1N.

Solución Inhibidores Enzimáticos	
Componentes	Cantidad y/o volumen
PMSF 100mM (Fenilmetil sulfonil fluoruro)	174 mg
Isopropanol o etanol al 70%	10 ml
Disolver con agitación constante, Mantener a -20°C	

Solución Inhibidores Enzimáticos	
Componentes	Cantidad y/o volumen
TLCK 5X (N-a-p-tosil-L-lisina clorometil-cetona)	5 mg
H ₂ O	1 ml
Disolver con agitación constante y prepararla al momento. A partir de esta solución 5X se hace una dilución para obtener una concentración de 1 mg/ml. Conservar a -20C.	

Solución Inhibidores Enzimáticos	
Componentes	Cantidad y/o volumen
TPCK 5X (N-Tosil-L-fenilamina clorometil cetona)	5 mg
Metanol	1 ml
Disolver con agitación constante y prepararla al momento. A partir de esta solución 5X se hace una dilución para obtener una concentración de 1 mg/ml, al momento de usarla. Se conserva a -20°C.	

Solución Inhibidores Enzimáticos	
Componentes	Cantidad y/o volumen
PHMB (sal sódica de p-hidroximercuribenzoato) al 0.04%	
PHMB	40 mg
NaOH 2N	1 ml

Solución Inhibidores Enzimáticos	
Componentes	Cantidad y/o volumen
PMSF (fenil metilsulfoilfluoruro) al 0.06%	
PMSF	6 mg
Isopropanol o etanol al 70%	1 ml

Hidróxido de Sodio 1N	
Componentes	Cantidad y/o volumen
NaOH	40 g
H ₂ O	1000 ml
Disolver en baño de hielo y con mucho cuidado, ya que la reacción es exotérmica	

Pepsina 1 %	
Proporción	
1 g de pepsina por cada 100 ml de suspensión	

HCl 1%	
Proporción	
1 ml de HCl concentrado por cada 100 ml de suspensión	

Solución Albúmina Sérica Bovina 1%	
Componentes	Cantidad y/o volumen
ABS	250 mg
PBS – Tween 20 al 0.05%	25 ml

Etanol 70%	
Componentes	Cantidad y/o volumen
Alcohol etílico	67 g
H ₂ O destilada	100 ml

- Se miden en una probeta 67ml de alcohol etílico.
- Se afora en la misma probeta a 100ml con agua destilada.
- La solución se guarda en un frasco de vidrio a 4°C.

Acrilamida – Bisacrilamida 30%	
Componentes	Cantidad y/o volumen
Acrilamida	29.2 g
Bisacrilamida	0.8 g
H ₂ O destilada	100 ml

- Se miden en una probeta 80ml de agua destilada.
- Se agregan a la probeta 29.2g de acrilamida y 0.8g de bisacrilamida.
- Se afora la solución a 100ml con agua destilada.
- La solución, se envasa en un frasco de vidrio, se rotula y se guarda a 4°C.
- Nota importante: tanto la acrilamida como la bisacrilamida se deben manejar con guantes, lentes de seguridad, cubre boca y bata, debido a que son sustancias neurotóxicas.

Tris – Base 2M pH 8.8	
Componentes	Cantidad y/o volumen
Tris – Base	24.22 g
H ₂ O destilada	100 ml

- Se miden en una probeta 80ml de agua destilada.
- Se agregan 24.22g de Tris-base y se disuelve.
- La solución se afora a 100ml con agua destilada.
- La solución, se envasa en un frasco de vidrio, se rotula y se guarda a 4°C.

SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) 10%	
Componentes	Cantidad y/o volumen
SDS	10 g
H ₂ O destilada	100 ml

- Se miden en una probeta 80ml de agua destilada.
- Se agregan 10g de SDS y se disuelve.
- La solución se afora a 100ml con agua destilada.
- La solución, se envasa en un frasco de vidrio, se rotula y se conserva a temperatura ambiente.

APS (Persulfato de Sodio) 10%	
Componentes	Cantidad y/o volumen
APS	50 mg
H ₂ O destilada	500 µL

- Se miden 450 µL de agua destilada en un tubo de ensayo.
- Se agregan 50 µg de APS y se disuelve.
- La solución, se hace en el momento de hacer los geles.

Solución de Lavado (PBS-Tween 0.05%)	
Componentes	Cantidad y/o volumen
PBS pH 7.2	1000 ml
Tween 20	500 µl

Solución Bloqueadora de Leche Descremada 5% en PBS-T 0.05%	
Componentes	Cantidad y/o volumen
Leche Descremada (Sveltes®)	5 g
PBS - Tween 20 al 5%	100 ml

Se guarda en un frasco de vidrio y a 4°C

Solución Amortiguadora de Carbonatos 0.1M pH 9.6	
Componentes	Cantidad y/o volumen
Na ₂ CO ₃	3.18 g
NaHCO ₃	5.86 g
H ₂ O destilada	1000 ml

- En una probeta medir 800ml de agua destilada y vaciarlo en un vaso de precipitado.
- Agregar 3.18g de Na₂CO₃ y disolver.
- Agregar 5.86g de NaHCO₃ y disolver.
- Se ajusta el pH a 9.6 con HCl 1N o NaOH 1N.
- Aforar a 1000ml.
- Envasar en un frasco de vidrio, etiquetar y guardar a 4°C.

Buffer Citrato – Fosfato 75 mM pH 5.0	
---------------------------------------	--

Componentes		Cantidad y/o volumen
Ácido Cítrico		1.92 g
Na ₂ HPO ₄		2.85 g
H ₂ O		100 ml

Sustrato para ELISA (<i>Trichinella spiralis</i>)		Cantidad y/o volumen
Buffer Citrato – Fosfato 75mM		10 ml
o-fenil-diamina (en congelación)		5 µg
H ₂ O ₂ al 30%		12 µl

Sustrato para Western Blot (<i>Trichinella spiralis</i>)		Cantidad y/o volumen
4-cloro-1-naftol		50 µl
Metanol		10 ml
PBS pH 7.2		50 ml
H ₂ O ₂ al 30%		12 µl

- Se pesan 50µg de 4-cloro-1-naftol.
- Se le adiciona lentamente 10ml de metanol.
- A esta mezcla se le adicionan 50ml de PBS pH 7.2
- A esta solución se le adiciona 8µl de H₂O₂ 30% y se disuelve.
- La solución se usa en el momento, cuidando de que no adquiera color antes de ser usada.

Solución H ₂ SO ₄ 2N		Cantidad y/o volumen
H ₂ SO ₄ Concentrado		53.3 ml
H ₂ O destilada		1000 ml
Agregar lentamente el ácido al agua, manteniendo el matraz aforado en baño de hielo		

Regulador de Transferencia Tris 0.025 M, Glicina 0.125 M, pH 8.3 Metanol al 20% v/v		Cantidad y/o volumen
Tris – Base 2M pH 8.8		12.5 ml
Glicina		14.49 g
Metanol		200 ml
H ₂ O destilada		800 ml

Rojo de Ponceau S al 0.2%.		Cantidad y/o volumen
Rojo de Ponceau S		200 mg
Ácido Tricloro acético (ATA) al 30%		100 ml
(0.3 g ATA en 100 ml de H ₂ O) Conservar 4°C.		

APENDICE III

NOMENCLATURA

Ac´s.: Anticuerpos.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ASB: Albúmina Sérica Bovina.

APS: Persulfato de Sodio.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ATA: Ácido tricloro acético.

EBNA1: Epstein-Barr virus nuclear antigen 1, traducido a español: Virus Epstein-Barr antígeno nuclear 1.

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético.

ELISA: Del ingles Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, traducido a español: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).

ETA: Extracto Total Antigénico.

E/S: Excreción-Secreción.

HI: Inhibición de la hemaglutinación.

IET: Inmunolectrotransferencia.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgE: Inmunoglobulina E.

IgM: Inmunoglobulina M.

IgG: Inmunoglobulina G.

IL: Interleucina.

InDRE: INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS

kDa: Kilodaltones.

L1: Larva muscular enquistada.

LM: Larva muscular.

LP: Lamina propia.

LRN: Larva recién nacida.

mM: Milimolar

M: Concentración molar.

N: Concentración normal.

NC: Nitro Celulosa.

nm: nanómetros.

B

NOM: Norma Oficial Mexicana.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.

PBS-T: Solución amortiguadora de fosfatos adicionada con Tween 20

PCR: Polymerase chain reaction, traducido a español reacción en cadena de la polimerasa.

pH: Concentración de iones hidronio [H₃O⁺].

PHMB: sal sódica de p-hidroximercuribenzoato.

PMSF: Fenilmetil sulfonil fluoruro.

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio.

TLCK: N-alfa-p-tosil-L-lisina clorometil-cetona

TPCK: N-Tosil-L-fenilamina clorometil cetona.

v/v: Concentración Volumen - Volumen

WB: Western Blot.

µg: microgramos

µL: microlitros

µm: micrómetros