



Grupo *Trichinella* & Trichinellosis, , Departamento de Parasitología, INEI, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán.

Integrantes del grupo de investigación

Área de Diagnostico Serológico

Bioq. Patricia A. Arbusti
Tec. Graciana E. Ayesa
Téc. Marcela Monfellano

Área de Biología Molecular

Lic. Silvio J. Krivokapich
Bioq. Cinthia L. Gonzalez Prous
Bioq. Graciana M. Gatti

Área de Salud Pública

Eduardo A. Guarnera

Direcciones y contactos

Patricia A. Arbusti,; parbusti@anlis.gov.ar, 011-4301-7437
Silvio J. Krivokapich silkri@anlis.gov.ar , 011-4301-7437
Eduardo A. Guarnera: equarnera@anlis.gov.ar, 011-4301-7437

Áreas temáticas y perfiles de la investigación

Nuestra área temática son los nematodos zoonóticos y las investigaciones están orientadas a desarrollar técnicas diagnósticas en animales y en humanos, realizar estudios de campo y diseñar experimentos tendientes a contribuir al conocimiento y auxiliar a los programas de vigilancia, prevención y control de esas parasitosis en Argentina.

Evolución histórica:

Área de Diagnostico Serológico

En la década de 1960 el Servicio de Helmintología del Instituto nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán" inició su actividad en Trichinellosis produciendo el antígeno para realizar el diagnóstico humano por la técnica de Bachman, y dentro del mismo periodo se adaptó y utilizó la técnica de la bentonita.

En el año 1980 con la creación del Departamento de Parasitología, arribó el primer aislamiento de *Trichinella spiralis* de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, posteriormente registrado con el código ISS643 en el centro Internacional de Referencia de *Trichinella*, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia. A partir del mismo se comenzó producción de antígenos particulados junto al Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) para desarrollar la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.

En el periodo 1985-1989 el diagnóstico en humanos y cerdos se realizó por inmunofluorescencia indirecta.

En el año 1989 se finalizó un trabajo para identificar las fracciones antigénicas del antígeno excretor/secretor a partir del cultivo de larvas musculares en condiciones específicas (1,2). El producto se obtuvo del aislamiento de referencia ISS643. Con los antígenos purificados y concentrados se desarrolló un sistema de diagnóstico en serie: ELISA indirecto/western-Blot. Ambos



se evaluaron en infecciones naturales en personas y con sueros de cerdos infectados natural y experimentalmente.

El desarrollo de la técnica en cerdos se hizo con fines de montar un sistema de vigilancia epidemiológica en cerdos de cría no tecnificada "intra vitan" como procedimiento de prevención primaria de la Trichinellosis del hombre (3,4,5,6).

En el marco del proceso de validación del método, se determinó el valor de corte (cut-off), de la técnica de ELISA que se desarrolló en este Departamento, utilizando las curvas TG-Roc. El valor del título de corte se ajustó para obtener la máxima sensibilidad del screening. Con fines de validación se realizaron estudios comparativos entre las técnicas directas (Trichinoscopía y Digestión Artificial) e indirectas (ELISA y Western blot), utilizadas para el serodiagnóstico de Trichinellosis en cerdos (7) (8) (9). Posteriormente se llevaron a cabo relevamientos serológicos de zonas endémicas donde es habitual la cría de animales de traspatio, utilizando ELISA como técnica de tamizaje y Western blot como método de serodiagnóstico confirmatorio. La aplicación de éste sistema ha permitido la detección de focos de Trichinellosis porcina, el sacrificio de los animales detectados como positivos, su posterior análisis mediante Digestión Artificial y el seguimiento de los sospechosos como estrategia de vigilancia. (10,11). En estos trabajos cooperaron la Facultad de Veterinaria de Esperanza (UNL), el programa de zoonosis de Río Negro, y Zoonosis de la Municipalidad de Neuquén.

A través de la conformación de una seroteca de sueros porcinos, de la cual forman parte las muestras tomadas para los relevamientos serológicos y estudios comparativos, se han podido evaluar los resultados obtenidos del ELISA in-house desarrollado en nuestro laboratorio, frente a otras tres técnicas de ELISA y 2 Surface Plasmon Resonance test (SPR) a partir del procesamiento de estos mismos en un laboratorio externo. (Animal Sciences Group Of. Wageningen UR, Lelystad, The Netherlands)(12,13,14)

Con la disponibilidad de las técnicas de diagnóstico:

- Se desarrollaron sistemas de vigilancia epidemiológica
- Se propusieron actividades de saneamiento de piaras familiares de cría artesanal

Con la finalidad de fortalecer estas actividades se han realizado a la fecha 14 cursos anuales de Trichinellosis para personal de las Direcciones de Zoonosis provinciales y responsables de pequeños emprendimientos locales y se realizaron 3 reuniones nacionales y 4 regionales para fortalecimiento de estas actividades.

Desde el año 2004 el Servicio de *Trichinella* y Trichinellosis es el laboratorio nacional de referencia del diagnóstico y cabecera de la red nacional de trichinellosis

Referencias bibliográficas

1. "Simple ion Exchange chromatography purification of a *Trichinella spiralis* metabolic antigen for diagnosis". G. Santillan, J. Garberi, V. Molina, A. Franco, E. Castelli, E. Guarnera. ICT 9, Mexico, 1996.
2. "Obtención y Caracterización de productos de excreción secreción de larvas de *Trichinella spiralis*". Santillán G., Molina V., Latapié L. Iº Congreso Argentino y Iº Congreso Latinoamericano de Zoonosis. Buenos Aires, 14 al 17 de agosto de 1995.
3. "Inmunología de la Triquinosis en un modelo experimental en cerdos", II Congreso Argentino de Zoonosis y I Congreso Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. Buenos Aires, 14 al 17 de abril de 1998.
4. "Bases inmunológicas de la vigilancia epidemiológica ante morten de la Triquinosis", Franco A., Molina V., Ribicich M., Santillán G., Guarnera E., IV Congreso Brasileiro de Epidemiología EPIRIO 98
5. "Evaluation of ELISA Test for the diagnosis of porcine Trichinellosis", M. Ribicich, R.H. Gamble, S. Santillán, M. Miguez, V. Molina, E. Guarnera, N. Basso and A. Franco, The Pig Journal (2000) 46, 24-34)
6. "Inmunodiagnóstico de Triquinosis de cerdos a campo" Molina V., Monfellano M., Ribicich M., Franco A., Krivokapich S., Barreiro J. y Guarnera E., III Congreso Argentino de Zoonosis y II Congreso Latinoamericano de Zoonosis, 7 al 10 de agosto de 2001
7. "Porcine and rodent infection with *Trichinella*, in the Sierra Grande area of Rio Negro province, Argentina". Larriue E, Molina V, Albarracin S, Mancini S, Bigatti R, Ledesma L, Chiosso C, Krivokapich S, Herrero E, Guarnera E. Ann Trop Med Parasitol. 2004 Oct;98(7):725-31



8. "Sistema de diagnóstico inmunológico de Trichinellosis porcina ante-mortem" E. Guarnera, S Krivokapich, J. Peralta, E. Trabattoni, C. Paoletti, A. Baravalle, F. Bono, V. Molina, 2006, www.produccion-animal.com.ar
9. "Triquinosis: Historia natural en la localidad de Sierra Grande, Río Negro, Argentina". Larrieu, E. Molina, V. Albarracin, S. Mancini, S. Bigatti, R. Gatti, A. Ledesma, L. Chiosso, C. Krivokapich, S. Herrero, E. Revista de medicina veterinaria - Buenos A2005, VOL 86; NUMB 1, pages 3-7 ires-2005, vol 86; numb 1, pages 3-7
10. "Saneamiento de *Trichinella spiralis* en piaras familiares de la provincia de Neuquén" Premio AAPAVET 2004 "Dr Kart Wolffhugel", Viviana Molina, Héctor Bergagna, Carlos Prío, Silvio Krivokapich y Eduardo Guarnera. Asociación Argentina de Parasitología Veterinaria Mención Especial en la categoría Monografías originales de Actualización al trabajo
11. Estrategia de control de la Triquinosis para garantizar la seguridad alimentaria en carnes porcinas, Santa Clara, provincia de Santa Fe (Trabajo de Tesis, Universidad Nacional del Litoral, Facultad de ciencias Veterinarias)
12. "Diagnostic Test Evaluation For Trichinella Infections In Pigs – A Renewed Interaction Between Diagnostic Test Data And Their Statistical Analysis", Döpfer, Dörte¹, Kitty Maassen¹, R.P. Achterberg¹, Joke van der Giessen², Peter Teunis², W. Buist¹, Viviana Molina³, E. Guarnera³, M. Gonzales³, S. Krivokapich³, M. Rodriguez³, J.L. Peralta⁴, H. Trabattoni⁴, E. Larrieu⁵, and B. Engel¹ Contributed paper of the International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics, 6 - 11 August 2006, Cairns, Australia.
13. "Usefulness of sero-surveillance for Trichinella infections in animal populations". Teunis PF, Fonville MT, Döpfer DD, Eijck IA, Molina V, Guarnera E, van der Giessen JW. Vet Parasitol. 2009 Feb 23;159(3-4):345-9. Epub 2008 Nov 1
14. "Serological SPR assay for the detection of Trichinella antibodies in pigs evaluated against other assays by Bayesian statistics". Maassen, C.B.M.; Achterberg, R.P.; Haughey, S.; Areskoug, D.; Engel, B.; Giessen, J. van der; Fonville, M.; Teunis, P.; Heijden, H.J.W.M. van der; Wolf, P.J. van der; Molina, V.; Larrieu, E.; Peralta, J.L.; Dopfer, D.D.V. 7th. International Symposium, On the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork, Verona, Italy, 9 - 11 May, 2007.

Área Biología Molecular

Inicialmente en el año 2001, nuestro laboratorio comenzó a desempeñarse en estudios vigilancia epidemiológica y caracterización molecular a nivel especie, mediante las técnicas de nested-multiplex PCR de regiones variables de ADN ribosomal y PCR-RFLP del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo c oxidasa, de los aislamientos circulantes de *Trichinella* spp. en cerdos domésticos y animales sinantrópicos y silvestres de distintas regiones endémicas, con el fin de verificar los genotipos de *Trichinella* circulantes en la Argentina. Hasta el presente, el análisis de 284 aislamientos del parásito permitió establecer las variantes circulantes del agente etiológico, inferir la prevalencia, infectividad y distribución espacial de hospederos y establecer un banco de conservación de larvas musculares. Todos los aislamientos domésticos y sinantropicos estudiados fueron caracterizados como perteneciente a *T. spiralis*, la especie de mayor infectividad en cerdos y mas patogénica para el hombre, mientras que el análisis de los asilamientos silvestres evidencio infección por esa misma especie en jabalíes, armadillos (*Chaetophractus villosus*) y felinos (*Puma concolor*, *Oncifelis geoffroy*) (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). No obstante, no se detectaron infecciones en otros reservorios comunes de *Trichinella* como zorros (*Pseudalopex grisues*, *P. culpaeus*), ni tampoco en potenciales hospederos herbívoros, como la liebre europea (*Lepus europaeus*), donde se registró infección por *Trichinella* en otros países (5, 8). Por otro lado, el estudio en fauna silvestre derivó en el hallazgo y caracterización de un nuevo genotipo del parásito (*Trichinella* T12) en ejemplares de *Puma concolor*, donde la amplia distribución geográfica del hospedero sugiere la presencia de esta variante en aquellas provincias de Argentina o en países de la región donde la infección no ha sido reportada, ni en animales ni en el hombre. (5, 9, 10).

A partir del año 2006, se incorporó la línea de investigación sobre el complejo *Anisakis simplex* en peces de consumo humano, particularmente la Merluza (*Merluccius hubbsi*), con el fin de determinar la prevalencia y la identificación molecular de larvas L3 mediante PCR-RFLP de un fragmento de ADN ribosomal que comprende las regiones ITS1, ITS2 y 5.8S. Todas los ejemplares de merluza adquiridos en distintos comercios de Mar del Plata y Capital Federal resultaron parasitados con *Anisakis* donde la especie identificada correspondió a *A. pegreffii*, reportada como patogénica para el hombre. Aunque en Argentina no se han informado casos oficiales, estos datos denotan el riesgo de anisakiasis humana (11).



Finalmente, a mediados de 2008 se inicio el desarrollo de un sistema de caracterización molecular de *Toxocara* que redundó en la obtención de un herramienta diagnóstica, basada en PCR-RFLP de region ITS , con un patrón específico y diferencial de *T. canis* y *T. cati* con el fin de ser empleada en el futuro en la identificación a nivel especie de las muestras de suelos contaminadas con el parásito (12).

Referencias bibliográficas

1. Trichinellosis en Reservorios Silvestres y Sinantrópicos Vinculados con la Infección Humana en la República Argentina. Krivokapich S. J., I Congreso Bonaerense de Zoonosis .Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires. 2003, La Plata, Bs As, Argentina.
2. Porcine and rodent infection with *Trichinella*, in the Sierra Grande area of Rio Negro province, Argentina. Larrieu E, Molina V, Albarracín S, Mancini S, Bigatti R, Ledesma L, Chiosso C, Krivokapich S, Herrero E, Guarnera E Ann Trop Med Parasitol. 2004 Oct;98(7):725-31
3. Caracterización Molecular de aislamientos de *Trichinella* I. Congreso Panamericano de Zoonosis - Krivokapich S. 2006 V Congreso Argentino de Zoonosis - II Congreso Bonaerense de Zoonosis, La Plata, Argentina
4. Epidemiological survey of *Trichinella* infection in domestic, synanthropic and sylvatic animals from Argentina. Krivokapich S J, Molina V, Bergagna H F J, Guarnera E A . 2006 . Journal of helminthology, Sep;80(3):267-269
5. Wild animals as reservoir of *Trichinella* spp. in the Patagonic region. Krivokapich S. J., Gatti G. M., Gonzalez Prous C. L., Saldía L., Bergagna H., Chang Reissig E. , Molina V. , Guarnera E. A. 22nd Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Agosto 2009, Calgary, Canada.
6. Identificación molecular de aislamientos de *Trichinella* spp de la república argentina. Gatti G., González Prous C., Bolpe J., Bergagna H., Larrieu E., López I., Malandrini B., Samitier R., Garofalo F., Guarnera E., Krivokapich S. XIX Congreso Latinoamericano de Parasitología, Asunción, Paraguay, Octubre 2009.
7. Infección por *Trichinella spiralis* en Animales Domésticos, Sinantrópicos y Silvestres en Distintas Regiones Endémicas de la República Argentina Gatti, G., Gonzalez Prous, C., Bergagna H. F. J. b., Molina, V.; Guarnera, E.; Krivokapich, S. 2005. XVII Congreso Latinoamericano de Parasitología - IV Congreso Argentino de Parasitología - XXIX Jornadas Internacionales de Hidatidología Mar del Plata, Argentina
8. Estudio sobre la Infección experimental y natural de *Trichinella* en la liebre europea *Lepus europaeus*. Gonzalez Prous C, Gatti G, Genzano M, Ponassi A., Bolpe Jb, Molina V., Guarnera E., Krivokapich S. 2005. XVII Congreso Latinoamericano de Parasitología - IV Congreso Argentino de Parasitología - XXIX Jornadas Internacionales de Hidatidología. Mar del Plata, Argentina
9. Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. Krivokapich S, Gonzalez Prous C., Gatti G., Molina V., Matarasso H., Guarnera E.. 2007. XII International conference on Trichinellosis, Plitvice Lakes, Croacia
10. Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. . Krivokapich S J, Gonzalez Prous C L, Gatti G M, Confalonieri V, Molina V, Matarasso H, Guarnera E 2008. Veterinary Parasitology 156 (2008) 234–240
11. Identificación Molecular de Aislamientos del Complejo *Anisakis Simplex*. Hutler Wolkowicz i, Guarnera E. Krivokapich, S. Congreso. 3er Congreso Latinoamericano y 6to Congreso Argentino de Zoonosis. 2008 Buenos Aires- Argentina.
12. Diferenciación molecular de *Toxocara cati* y *T. canis* mediante RFLP de la region ITS-1. Gonzalez Proas C. L., Gatti G. M., Santillan G., Cabrera M., Guarnera E., Krivokapich S. J.. World Association of veterinary laboratory Diagnosticians (WAVLD 2009) - 14th International Symposium, Madrid, Spain 17-20 June 2009.

Líneas actuales de investigación

- Identificación de aislamientos domésticos, sinantrópicos y silvestres de *Trichinella* spp.
Graciana Gatti, Silvio J. Krivokapich



- Diferenciación molecular de *Toxocara canis* y *T. cati* en muestras ambientales. **Cinthia L. Gonzalez Prous, Silvio J. Krivokapich**
- Determinación y análisis de *Anisakis* en peces de consumo. **Cinthia L. Gonzalez Prous , Graciana Gatti, Silvio J. Krivokapich**
- Mejorar la performance de la técnica de ELISA como en el estudio de proteínas antigénicas para su utilización en inmunodiagnóstico. **Patricia A. Arbusti, Silvio J. Krivokapich**