

Efecto de la temperatura en la viabilidad e infectividad de *Trichinella spiralis*

*Elsa G. Chávez Guajardo, ** José Jesús Muñoz Escobedo., ***Gabriela Reveles Hernández., ** Jesús Rivas Gutiérrez., ***María Alejandra Moreno García
*Unidad de Ciencias Químicas; **Unidad de Odontología; ***Unidad de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas. Apartado 12 Guadalupe Zacatecas. México.

E.Mail: amoreno_29@hotmail.com

Recibido:06/04/2007

Aceptado: 10/06/2007

Resumen

Introducción: *Trichinella spiralis* es el parásito causante de la Trichinellosis una zoonosis endémica en nuestro estado la cual afecta a mamíferos entre ellos el humano. La principal causa de infección para este es el consumo de carne mal cocida de cerdo infectada con la larva infectante (LI) de *T. spiralis*. El propósito de este trabajo es determinar el efecto que tiene la temperatura sobre este parásito para poder proporcionar a la población medidas profilácticas las cuales se puedan poner en práctica de manera sencilla y económica contra esta enfermedad. **Material y Métodos:** En este estudio se utilizaron 2 modelos experimentales: A) 2 cerdos raza York de 6 meses de edad (control y problema) el control sin infección y un problema infectado con *T. spiralis* para evaluar el efecto de la temperatura (cocción, frita, horno de microondas, olla de presión, refrigeración y congelación) en la viabilidad e infectividad por medio de digestión artificial para obtener paquete larvario y observación directa al microscopio por compresión para observar sus características físicas y B) 3 ratas Long Evans se inocularon con muestras de carne (de cada procesamiento de temperatura) infectada obtenida del modelo de cerdo en cuánto a los resultados de los procedimientos empleados a temperaturas altas (cocción y frita) por compresión en la cocción a 96°C la viabilidad dió positiva hasta los 30 min. Después de este tiempo sus características no fueron viables (sus características físicas se observaron alteradas), en cuánto a la Infectividad (capacidad de completar su ciclo vital), se observó positiva hasta el minuto 30, después de este tiempo la Infectividad fue negativa. La carne frita a 450°C la viabilidad fue positiva hasta el minuto 60 igualmente la infectividad, a temperaturas bajas (refrigeración y congelación), en refrigeración a 4°C analizada del día 0 al 120 la viabilidad se observó positiva hasta el día 120 (es decir sus características físicas no mostraron alteraciones) la Infectividad se observó igualmente positiva hasta el día 120 en cuánto al proceso de congelación a -20°C, -40°C y -50°C al día 30 se observó negativo al igual que la Infectividad que se observó negativa, en el horno de microondas a temperatura media microondas a un tiempo de 10, 20 y 30 minutos la viabilidad del parásito se mostró positiva al minuto 30 al igual que la Infectividad

positiva al minuto 30, en la carne sometida a cocimiento en la olla de presión a los 30 minutos la Infectividad y viabilidad fueron negativas.

Conclusión: Al observar los resultados obtenidos podemos concluir que *T. spiralis* es un parásito con gran capacidad de resistencia a condiciones extremas de temperatura, siendo efectivo el cocimiento de la carne en la olla de presión a los 30 minutos la infectividad y viabilidad fue negativa, en caso de no contar con olla de presión lo adecuado es cocer la carne por 60 minutos a ebullición y luego prepararla al gusto, con estas medidas el parásito pierde viabilidad e infectividad.

Palabras Claves: Temperatura, Viabilidad, Infectividad, *Trichinella spiralis*.

Summary

Introduction: The Trichinellosis is caused by the parasite *Trichinella spiralis* this is a endemic zoonosis in the state which affected to a big number of mammals between they the human, the principal cause of infection for this is the corrode of infected meat of pig with infected wiss (IW) of *T.spiralis* bad cooked, the purpose of this work was analyzed the temperature effect about the viability and the effectivity of *Tspiralis* and established measures profilácticas against this illness which can be of utility for the population and put in practice in manner easy and economic. **Material and methods:** In this study were used 2 experimental models: A) Two pigs York race of 6 months old (control and problem) a control without infection and a problem infected with *T.spiralis* to evaluate the effect of the temperature (cooked, fry, microwave, pressure cooker, refrigeration and freezing, in the viability and infectivity in the way of artificial digestion for obtain wiss packet and directly observation on microscope by the artificial for compression for observe its physical characteristics and B) Three Long Evans rats enocularon with show submit meat to the different temperature intervals, process of cook and freezing, obtained of the pig model, about the result from

the employed proceeding to high temperature (cooked and fry) for the method of compression in the cooked at 96 C the viability gave positive until the minute 30 after this time the infectivity was negative. The fry meat at 450 C the viability was positive until the minute 60 equally the infectivity, at low temperatures (refrigeration and freezing) in refrigerator at 4 C analyzed of the day = at 120 the viability observed was positive until the day 120 (it physical characteristics didn't show alterations) the infectivity observed equally positive until the day 120 in the process of freezing until at -20 C, -40 C, -50 C at the day 30 observed negative a equally at the infectivity the observed negative, in the microwave to half temperature in a time of 10,20,30 minutes the viability of the parasite showed positive at the minute 30 equally that the positive infected at minute 30, in the cook meat submit in pressure cooker at the 30 minutes the infectivity and viability were negative. Conclusion: Observing the obtain results we can conclude that *T.spiralis* is a parasite with a big capacity of resistance at extremes conditions of temperature, being knowledge effective of the meat in the pressure cooker at 30 minutes the infectivity and viability is negative, in case of no count with pressure cooker the adequate is cook the meat for 60 minutes at boiling and then prepare at pleasure, with this measure the parasite lost viability and infectivity.

Key Words: Temperature, Viability, Infectivity, *Trichinella spiralis*.

Introducción

La Trichinellosis, es una enfermedad parasitaria causada por el nematodo *T. spiralis* que afecta a mamíferos silvestres y domésticos, esta se ha reportado en casi todo el mundo y su prevalencia es alta en Europa y Asia, esta se trasmite de modo accidental al hombre por ingestión de carne o productos cárnicos crudos o insuficientemente cocinados, procedentes de animales infectados¹.

La principal fuente de infección para el hombre es el cerdo. Es importante mencionar la dificultad y baja incidencia de detección de la enfermedad, el ineficiente control sanitario en la canal del cerdo contaminado y la practica frecuente de matanza clandestina en animales de trans-patio. El propósito de este trabajo es analizar el efecto que tiene la temperatura sobre este parásito para poder dar a la población medidas profilácticas las cuales se puedan poner en practica de manera sencilla y económica contra esta enfermedad.

Objetivo

Evaluar el efecto de la temperatura en la viabilidad e infectividad de *T. spiralis*.

Justificación

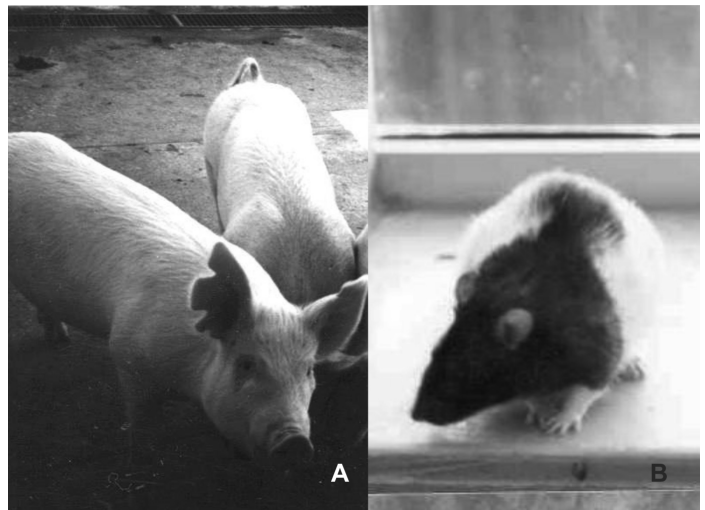
En los últimos años la Trichinellosis ha tenido un asenso en todo el mundo, en la Unión Europea se han presentado brotes en Alemania, Italia, España, Rusia, y en América, se han presentado brotes en Chile y Argentina, en nuestro país se ha presentado en varios estados de la Republica Mexicana donde no se había reportado, y aun casos donde se había echo la inspección sanitaria y se había mantenido en refrigeración y posteriormente se había utilizado para la elaboración de salchicha como fue el caso de Alemania. De ahí la importancia de una valoración del efecto de la temperatura

en la viabilidad e infectividad de *T. spiralis*.

Material y Métodos

Modelos experimentales

Dos cerdos de raza York (Fotografía No. 1A) de 6 meses de edad, uno de ellos utilizado como control (cerdo sin infección) el segundo cerdo fue infectado vía oral con 1 LI de *T. spiralis* por gramo de peso este fue sangrado cada 2 semanas y a los sueros se les realizó Microinmunodifusión (MIDD), Inmuno-electrotransferencia (IET), para caracterizar la respuesta inmune posteriormente, el cerdo fue sacrificado a las 8 semanas post-infección se tomaron muestras de tejido muscular (diafragma, macetero, lengua, piernas e intercostales), se sometieron a los siguientes procesos (Cuadro No. 1):



Fotografía No. 1 Modelos experimentales: En A se muestran 2 cerdos raza York de aproximadamente 6 meses de edad, en B rata Longs Evans

Cuadro 1				
Refrigeración (°C)	4			
Congelación Temperatura (°C)	-20	-40	-50	
Se evaluaron cada 10 días por 120 días estas analizadas por compresión y digestión artificial esto para evaluar la viabilidad de la LI. de <i>T. spiralis</i> (características físicas de la célula nodriza), por medio de la observación directa al microscopio óptico.				
Temperatura de cocción: 96°C ↓				
Tiempo (minutos)	10	20	30	60
Carne sometida a la temperatura media en horno de micro ondas				
Tiempo (minutos)	10	20	30	
Carne Frita a temperatura: 450°C				
Tiempo (minutos)	10	20	30	60
Carne sometida a cocimiento en olla de presión				
Tiempo (minutos)	30			

Metodología

Muestras de carne infectada con *T.spiralis* obtenidas y sometidas a diferentes temperaturas y tiempos.

La carne sometida a estos procesos se dió al modelo de

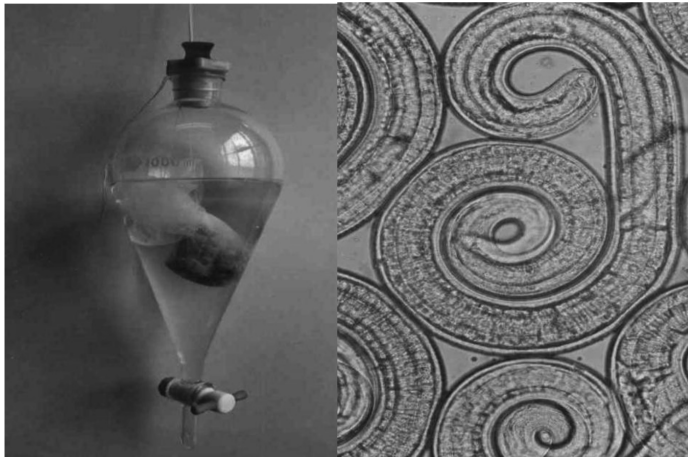
rata Long Evans (fotografía No.1 B) (3 ratas por cada una de las muestras) para evaluar Infectividad, por técnicas directas (compresión y digestión artificial) e indirectas (MIDD y IET).

Técnica de Compresión

Después de 12 semanas de infección se sacrificaron los modelos experimentales (cerdo) obteniéndose por disección la carne, se observó por compresión en placa, 0.5 g de los tejidos de diafragma, macetero, lengua, intercostales y pierna, presionando cada uno entre dos laminillas de vidrio, verificando la presencia de LI de *T. spiralis* al microscopio óptico con el objetivo 10X , 20 X ².

Técnica de Digestión Artificial

El proceso se llevó a cabo a 37° C por 24 horas según el método descrito por Del Río³, donde se colocan 30 g de tejido infectado triturado, en un tamiz de tul, en forma de saco; suspendido en una solución al 0.03% de pepsina (10,000 U) y HCl al 37 % (0.2M) en un litro de agua destilada en un embudo de separación; transcurridas las 24 horas se procedió a separar las LI de *T. spiralis* que se depositaron en el fondo del embudo de separación (Fotografía No. 2).



Fotografía No. 2 Digestión artificial. En A se muestra embudo de separación el cual contiene solución digestora (pepsina ácido clorhídrico) y saco con carne infectada para la obtención de paquete larvario. En B se muestran LI de *T. spiralis* observadas en el microscopio óptico con el objetivo de 20x.

El cerdo control recibió el mismo tratamiento.

Para caracterizar la respuesta inmune se obtuvo el antígeno soluble total de *T. spiralis*.

Obtención del Antígeno Soluble Total de *T. spiralis*.

El cual se utiliza en las técnicas Indirectas se inicia su obtención con lo señalado en la digestión artificial, posterior de la obtención de las LI se sometieron a varios lavados con solución básica de fosfatos (PBS), se desengrasaron con acetona absoluta a evaporación y se mantuvieron en PBS, a continuación se procedió a sonicar con la finalidad de romper cutícula y vaciar el contenido antigénico de las LI de *T. spiralis*, se centrifugó a 3500 rpm por 1.50 horas; El sobrenadante contiene el antígeno soluble total (AST)⁴ mismo que se usó como antígeno para las diferentes pruebas en el modelo experimental porcino y murino.

B) Extracción con Nitrógeno Líquido

Otra manera en que se obtuvo el antígeno de *T. spiralis*, fue por medio de la extracción con nitrógeno líquido, según An-

diva y col⁵. Con algunas modificaciones⁶, se extrajeron las larvas por medio de la técnica de digestión artificial anteriormente descrita, las LI de *T. spiralis* depositadas en el embudo de separación se lavaron con PBS para retirar excesos de la solución artificial de jugos gástricos, se añadió el nitrógeno líquido en cantidad suficiente asegurando se cubrieran las LI de *T. spiralis* durante 10 min. Y por estallamiento permitió la salida de los componentes antigénicos. Se centrifugó a 3500 rpm por 1.5 hrs., el sobrenadante fue el antígeno, el cual fue congelado hasta que se utilizó en las diferentes pruebas.

Determinación de Proteínas

Se obtuvo una curva estándar usando Albúmina Sérica Bovina, según la metodología de Bradford⁷, ajustando la concentración de proteínas obtenidas a una densidad óptica de 610 nm mediante azul de Coomassie al 0.06% preparado en HCl al 2.2%.

Interpolando el valor de la densidad óptica del antígeno, a la de la curva estándar de albúmina, se conoció el valor de la concentración de proteínas contenidas en los dos tipos de antígeno.

Corrimiento Electroforético en Geles de Poliacrilamida (EGPA).

Se usaron geles de 8 X 10 cm., preparados con dodesil sulfato de sodio (SDS), en condiciones reductoras según lo propuesto por Laemmli⁸ con una concentración al 12% del gel separador el cual se preparó como sigue: 3.84 ml de Acrilamida-Bis-Acrilamida en una relación en proporción de 30:08% respectivamente, 2.4ml de Tris 1.5 M pH 8.8, 3.2 ml de agua destilada, 100 µl de DSS al 10% , 5 µl de Temed y 50 µl de persulfato de amonio al 10%.

El gel del 4%, concentrador, se preparó con 1.33 ml de Acrilamida-Bis-Acrilamida con una relación en proporción de 30:08%, 2.5 ml de Tris 0.5 M pH 6.8, 6.1 ml de agua destilada, 100 µl de DSS al 10%, 16 µl de Temed y 80 µl de persulfato de amonio al 10%.

A cada carril se le colocaron 40 µl del antígeno, equivalente a una concentración de 36 µg de proteína la cual fue preparada por ebullición por 5 min., en una solución reductora de Tris - HCl 1 M pH de 6.8; glicerol; SDS al 2%; azul de bromo fenol al 0.5%, etilen diamin tetra acético (EDTA); agua destilada, di- tiotreitól 5 Mm. y 2-β -mercaptoetanol al 5%.

El corrimiento se realizó en una cámara de Protean II xi Cell (Bio- Rad), utilizando un buffer de corrimiento preparado con 12 g de Tris, 57.6 g de Glicina, 40 ml de DSS al 10 %, y agua destilada la necesaria para aforar a 1 L. Se dejó correr por espacio de dos horas, usando 100 miliamperes por gel. Se continuó con la tinción de uno de los geles con el colorante azul de Coomassie G- 250 y su secado en membranas de celofán.

Se usaron los siguientes marcadores de pesos moleculares: Fosforilasa (97 kDa), Albúmina sérica bovina (68 kDa), Ovo albúmina (43 kDa), Anhidrasa carbónica (24 kDa) y Lisosima (14 kDa); el otro gel se usó para transferencia a papel de nitrocelulosa (NC).

Microinmunodifusión Doble (MIDD)

Se elaboró un gel de agar al 1% en agua destilada con 0.01 g de azida de sodio, para evitar contaminación; se colocó en una cantidad de 4.5 ml a 55°C sobre una laminilla de vidrio, una vez en forma sólida, se procedió a formar la roseta con

un horador, con una equidistancia de 0.5 cm. entre pozo y pozo, la confrontación se hizo colocando siempre el antígeno en una cantidad de 20 μ l (18 μ g) en el centro y en torno a éste los sueros sin diluir, ocupando siempre un suero control positivo y otro negativo, se dejó a temperatura ambiente en cámara húmeda de 24 a 48 horas hasta la presencia de líneas de precipitación entre el suero control positivo y el antígeno; luego se procedió a teñir el gel con azul brillante de Coomassie G 250 en un 25 % en volumen⁹.

Inmunoelectrotransferencia (IET)

El producto obtenido del corrimiento en gel de Poliacrilamida se transfirió a papel de NC, de acuerdo a lo descrito por Towbin (10), utilizando un buffer de transferencia preparado como sigue: 6.05 g de Tris 0.025 M, 28.8 g de Glicina 0.19M, 200 ml de metanol al 20% y agua destilada la necesaria para aforar a 1 L. Utilizando la cámara de Transblot-Cell (Bio-Rad®) a 35 voltios, durante toda la noche a 4 °C.

El papel de NC fue teñido con fast green (verde rápido) por 5 min. con agitación constante se retiró el colorante y fue decolorado en agua destilada para verificar transferencia de las proteínas, se dejó secar y se cortaron las tiras de un ancho aproximado de cada carril de 0.5 cm.

Transcurrido lo anterior, se procedió a cubrir cada tira con una solución de PBS- leche descremada al 3% y azida de sodio al 0.15% a 4°C, con agitación constante por toda la noche. Enseguida se lavaron 3 veces por 10 min. con PBS, se continuó con la incubación por 1.5 hr. con los sueros problemas en una dilución de 1:100 en PBS- leche en polvo al 3% a 37°C con agitación constante; se lavaron enseguida por dos ocasiones con PBS- Tween 20 al 0.3% por 10 min. y tres más con PBS por 10 min. A continuación se incubó con el segundo anticuerpo Anti- IgG de cerdo o murino, conjugado con peroxidasa 1: 2000 PBS- leche en polvo al 3% por 1 hr. a temperatura ambiente, con agitación; después se lavaron 2 veces con PBS- Tween 20 al 3% y se enjuagaron con PBS por 10 min.

El patrón de Bando de cada tira se reveló con 3,3-DAB, 50 mg en 100 ml de PBS, usando, como sustrato, peróxido de hidrógeno al 37%.

Resultados

Características del antígeno soluble de *T. spiralis*.

Al realizar al AST de *T. spiralis* detectamos la presencia de 3 bandas inmunodominantes (42, 45, 48 kDa) las cuales están en un rango de 12-97kDa con ambas extracciones.

Respuesta inmune por técnicas indirectas

La MIDD los resultados que observamos nos indican positivo desde la cuarta semana se observó la presencia de bandas de precipitación en gel, características de reconocimiento antígeno – anticuerpo en el cerdo infectado y en las ratas Long Evans (Fotografía No. 3) que hubo reproducción del ciclo vital del parásito. Los controles fueron negativos.

En la IET se detectó la presencia del triplete de 42,45,48 kDa así mismo la banda de 67 kDa, estos presentes a partir de la segunda semana post-infección del modelo experimental en cerdo (fotografía No. 4) y murino, los controles fueron negativos.

Técnicas directas

De la compresión de los diferentes músculos (macetero, lengua, pierna, intercostales, diafragma) se observó LI de *T. spiralis*.

En la digestión artificial se detectaron LI de *T. spiralis* con viabilidad hasta el día 120 en carne refrigerada a 4 °C.

La carne sometida a cocción a 96°C por intervalos de tiempo de 10,20,30 y 60 se obtuvieron LI de *T. spiralis* y su viabilidad se mostró positiva hasta el minuto 30 (fotografía No. 5) es decir la morfología del parásito estaba intacta al minuto 60 se observaron modificaciones esta muestra se mostró con capacidad infectante hasta el minuto 30, frita a 450°C en los mismos intervalos de temperatura de la muestra sometida a cocción (10, 20, 30, y 60 min.). Se obtuvieron LI la viabilidad se observó positiva hasta el minuto 60 al igual que la Infectividad (fotografía No. 6) las muestras sometidas a temperatura media en el horno de microondas a un tiempo de 10, 20 y 30 minutos la viabilidad del parásito se mostró positiva al minuto 30 al igual que la Infectividad positiva al minuto 30. La carne sometida a refrigeración a 4°C en un intervalo de 0 a 120 días (analizada cada 10 días) la viabilidad se observó positiva hasta el día 120 en cuánto a la infectividad fue positiva hasta el día 120 (fotografía No.7). La viabilidad e Infectividad fueron positivas hasta el día 120. Las sometidas a congelación a temperaturas de -20, -30, -50°C al día 30, se observaron no viables con modificaciones en su estructura la Infectividad fue también negativa al día 30, en la carne sometida a cocimiento en la olla de presión a los 30 minutos la Infectividad y viabilidad fue negativa. El ciclo vital del parásito no se reprodujo en el antes mencionado. Al mencionar nosotros que la viabilidad se mostró positiva nos referimos a sus características morfológicas que son las siguientes presentando el característico enrollamiento en forma de espiral de color blanquecino, presenta cuerpo cuticular, abertura oral, esófago, esticosoma, intestino medio, posterior y cloaca, el cerdo control sometido a estos mismos procedimientos resultando negativos todos los procedimientos.

Al dar carne infectada con *T. spiralis* obtenida del cerdo a la rata Long Evans (fotografía No. 1) su Infectividad se observó positiva, por técnicas directas e indirectas.

Cuadro 2 Resultados del sometimiento de la carne infectada con *T. spiralis* a diferentes temperaturas y tiempos y efecto sobre la viabilidad e infectividad

PROCEDIMIENTO	TIEMPO (MINUTOS)	VIABILIDAD	INFECTIVIDAD
Cocción a 96°C	10, 20, 30 y 60.	+ Hasta 30 min.	+ Hasta 30 min.
Frita a 450°C	10, 20, 30 y 60.	+ Hasta 60 min.	+ Hasta 60 min.
Refrigeración			
A 4°C	Del día 0 al 120.	+ Al día 120.	+ Al día 120.
Congelación			
-20°C	Del día 0 al 120.	- Al día 30.	- Al día 30.
-40°C	Del día 0 al 120.	- Al día 30.	- Al día 30.
-50°C	Del día 0 al 120.	- Al día 30.	- Al día 30.

Discusión

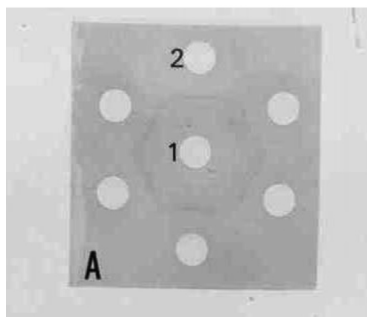
La temperatura juega un papel importante en la viabilidad e infectividad de *T. spiralis*, y su tolerancia a bajas y altas

temperaturas explica muchos brotes que se han presentado en donde la carne a pesar de ser sometida a refrigeración, fritura o incluso a cocción sigue siendo un vehículo de contaminación y trasmisión de la Trichinellosis.

Conclusión

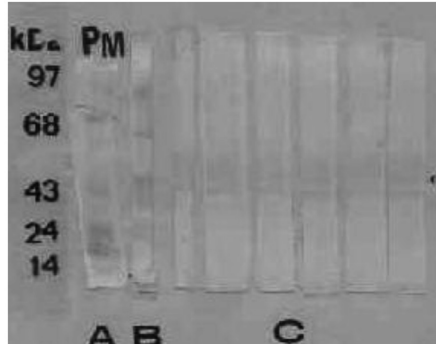
Al observar los resultados obtenidos podemos concluir que *T. spiralis* es un parásito con gran capacidad de resistencia a condiciones extremas de temperatura, siendo efectivo el cocimiento de la carne en la olla de presión a los 30 minutos la infectividad y viabilidad es negativa, en caso de no contar con olla de presión lo adecuado es cocer la carne por 60 minutos a ebullición y luego prepararla al gusto, con estas medidas el parásito pierde viabilidad e infectividad.

Por lo cual concluimos que *T. spiralis* es un parásito con gran capacidad de resistencia condiciones extremas de temperatura, siendo de vital importancia el proceso de cocción para evitar la infectividad y viabilidad del parásito.

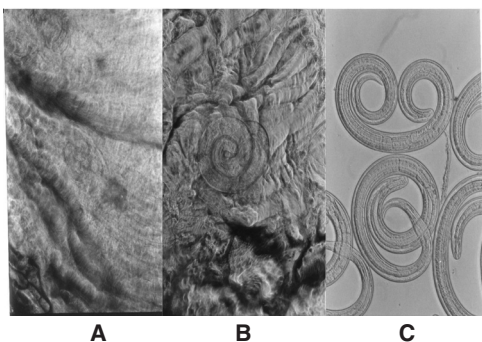


Fotografía No. 3 MIDD. En A en el orificio central 1 se depositó el AST de *T. spiralis* en los orificios periféricos 2 se depositó suero del cerdo infectado y se observan las bandas de precipitación características de la interacción Ag-Ac.

Triplete
42,45,48 kDa



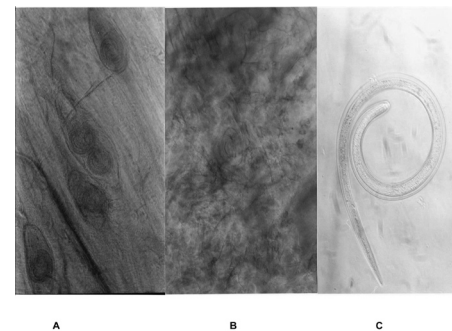
Fotografía No. 4 IET. En el carril A se observa el marcador de peso molecular que va en un rango de 14-97 kDa, en el carril B se observa el corrimiento del AST de *T. spiralis* en el se observan las bandas características de *T. spiralis*, en C se observa el corrimiento del suero del cerdo infectado en los diferentes tiempos de infección en el cual se observaron las bandas de 42,46 y 48 kDa



Fotografía No. 5.- Se observa tejido infectado con *Trichinella spiralis* sometido a cocción por 30 minutos, en A.- Compresión de tejido observada al microscopio óptico 10 X en donde la LI de *T. spiralis* se ve refractaria, en B.- a 40 X se observa la LI de *T. spiralis* sin su quiste pero viable y en C.- Digestión artificial del tejido anterior donde LI de *T. spiralis* están viables.



Fotografía No 6.- Se observa tejido infectado con *Trichinella spiralis* sometido al proceso de fritura a 450°C por 30 minutos, A.- Tejido observado por compresión al microscopio 10 X se detecta la LI de *T. spiralis* sin grandes modificaciones. B.-Compresión al microscopio 40 X la LI de *T. spiralis* aparentemente normal. C.- Digestión Artificial del tejido sometido al proceso de fritura, observado al microscopio óptico a 10X, LI *T. spiralis* normales.



Fotografía No 7.- Se observa tejido infectado con *Trichinella spiralis* sometido a refrigeración por 120 días a 4°C. A.- Compresión de tejido observado a microscopio óptico a 10 X LI de *T. spiralis* aparentemente normales. B.- Compresión de tejido observado a microscopio óptico a 40 X donde la LI de *T. spiralis* se ven modificación de su interior. C.- Digestión artificial del tejido anterior y se observan las LI de *T. spiralis* en semi-espiral sin modificaciones de su contenido.

Referencias

- Moreno A. y Muñoz J. J. 1993. Características De La Respuesta Inmune *Trichinella spiralis*. *Investigación Científica*. 1: 17-28.
- Moreno G. MA. , Vacio de la T. MR., Reveles H. RG. , Muñoz E JJ. 2001. Epidemiología de *T. spiralis* en el Estado de Zacatecas, México *Jornal Brasileiro de parasitología*. Vol. 37 no. 4:57
- Herrera R; Del Rio A; Avalos E. and Herrera R. M. 1987. *Trichinella spiralis*: Immunochemical Characterization Of Antigens In Experimental Infections. *Experimental Parasitology* 63:233-236.
- Moreno A., Avalos E y Muñoz J. J., Herrera R. 1995. Detección De Antígenos Inmuno-dominantes de *Trichinella spiralis* en conejo como modelo experimental. *Investigación Científica* 1(9) 3-8.
- Andiva S; Pret C; Haeghbaert S; Tourte C. – Schaefer J. Maganaval F; Xin S; Boireau P. and Dupouy Camet J. 2000 Evaluation of "Trichinella Wester blot IgG" kit in the diagnosis of human Trichinellosis Xth International Conference on Trichinellosis -Fountainebleau (France) p.107
- Moreno G. MA. , Reveles H. RG. , Saldivar E. SJ. , Muñoz E. JJ. 2000 los modelos experimentales, Herramientas de estudio en la Trichinellosis. *Revista Lat. De Microbiología*. 42:662.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal biochem*. 72: 248 – 254.
- Laemmli U. K., Favre M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage TA L DNA packing events. *J Mol Bio*. 80:5757.
- Oucherlony O. 1958. Diffusion in Gel Methods for Immunochemical Analysis in: *Progress Allergy*. Vol. V. Ed. Kellos, P., Basel and New York, Krager, New York. USA. 123-57
- Towbin H. T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from Poli-acrilamida gel to nitrocellulose Sheets. Procedure and some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 4350-4354.