

Evaluación del albendazol, ivermectina y nitazoxanida en infección causada por *trichinella spiralis* en modelo suino

María Isabel Chávez Ruvalcaba^{1,3}, Rosa Gabriela Reveles Hernández¹, Sergio J. Saldivar Elías¹, José Jesús Muñoz Escobedo², Mario R. Morales Vallarta³, *María Alejandra Moreno García¹

1.- Unidad Académica de Biología Experimental.

2.- Unidad Académica de Odontología. Universidad Autónoma de Zacatecas.

3.- Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Apartado Postal 12. Guadalupe. Zacatecas México. C.P. 98600.

Telefono: 01-492-92-4-62-42.

E. mail: amoreno_29@hotmail.com

Alejandra Moreno García. E. Mail: amoreno_29@hotmail.com

Financiado por CONACYT-SIVILLA 20020402002

Recibido: 23/10/2006

Aceptado: 25/11/2006

Resumen

La *Trichinellosis* es una enfermedad parasitaria zoonótica que se transmite de modo accidental al hombre por ingestión de productos cárnicos insuficientemente cocidos, procedentes de animales infectados. En México el cerdo actúa como principal fuente de contaminación, los tratamientos aplicados han sido inespecíficos.

Desconocemos a ciencia cierta el tratamiento efectivo para esta enfermedad. Este estudio está dirigido a conocer si el *Albendazol* (ABZ), la *Nitazoxanida* (NZX) y la *Ivermectina* (IVM) son efectivos en el tratamiento de la *fase intestinal* (FI) y *fase muscular* (FM) de la *Trichinellosis*. Así mismo consideramos conveniente conocer, cual de los tres fármacos es más efectivo contra el parásito *T. spiralis* en ambas fases. Se utilizaron 18 cerdos raza York, se formaron 10 grupos: 1- Control sano en FI, 2-Control infectado en FI, 3- Infectado tratado con ABZ en FI, 4- Infectado y tratado con NZX en FI, 5- Infectado y tratado con IVM en FI, 6-Control sano en FM, 7-Control infectado en FM, 8- Infectado y tratado con ABZ en FM, 9- Infectado y tratado con NZX en FM, 10- Infectado y tratado con IVM en FM. El grupo 1 y 6 fueron las mismas cifras y de igual forma el 2 y 7 para la realización del análisis estadístico que fue, un diseño experimental completamente al azar y un diseño de tratamientos factorial. Concluyendo que el ABZ además de ser más efectivo en fase intestinal, en fase muscular presenta una eficacia del 100% contra la infección.

Palabras claves: Antiparasitario, *Trichinella spiralis*, modelo suino.

Summary

Trichinellosis is a zoonotic parasitary disease which is accidentally transmitted to men by ingestion of meat products not well cooked, of infected animals. In Mexico the pig is the main source of contamination the applied treatment has been unspecific.

The effective treatment for this disease is not truly known. This study is led to know if *Albendazole* (ABZ), *Nitazoxanide* (NZX) and *Ivermectin* (IVM) are effective in the treatment of *intestinal phase* (IP) and *muscular phase* (MP) of *trichinellosis*. Therefore we consider convenient to know what medicament is more effective against the *T. spiralis* parasite in both phases. 18 York pigs were used, 10 groups were made: 1- healthy control in IP 2- infected control in IP, 3 – infected treated with ABZ in IP, 4 – infected and treated with IVM in IP, 5 – infected and treated with NZX in IP, 6.-healthy control in MP, 7.- infected control in MP, 8- infected and treated with ABZ in muscular phase (MP), 9 – infected and treated with IVM in MP, 10 – infected and treated with NZX in MP. The statistic analysis was an experimental design completely by random and a factorial treatment design. Concluding that the ABZ besides being but effective in FI in FM it presents an effectiveness of 100% against the infection.

Key words: Antiparasite, *Trichinella spiralis*, pig model.

La Trichinellosis es una enfermedad parasitaria zoonótica que afecta a mamíferos silvestres y domésticos, se trasmite de modo accidental al hombre por ingestión de carne insuficientemente cocinada, procedente de animales infectados.

Los agentes causales son diferentes géneros de Trichinella, que en estado larvario se enquistan en el tejido muscular de los mamíferos susceptibles, las cuales pueden sobrevivir muchos años en tejido muscular del hospedero, se han encontrado larvas infectantes después de 4 meses en carnes en estado de descomposición.

En México la principal fuente de infección para el hombre es el cerdo, el equino en países europeos y el oso en Norte América donde acostumbran su consumo.

La manifestación clínica en el hombre es variable, dependiendo de la sensibilidad del individuo, y de la cantidad de larvas ingeridas.

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 práctica frecuente de matanza clandestina en animales de traspato.

Con el estudio de fármacos que actúen de manera adecuada en la fase intestinal y muscular se contribuye a disminuir la probabilidad de transmisión de la enfermedad al hombre y con los que actúen efectivamente en fase muscular, se favorece al saneamiento de la carne.

Algunos fármacos antihelmínticos actúan en formas adultas de nemátodos a nivel gastrointestinal, Marinculic¹⁴ menciona que el tratamiento con Flubendazol (FBZ) en su ensayo en parásitos adultos fue 100% efectivo, con dosis de 8 mg/kg y 16 mg/kg por 6 y 14 días respectivamente, después de la infección por Trichinella spiralis (T. spiralis). Chung¹ afirma que el FBZ es más efectivo que el Albendazol (ABZ) en la fase adulta de T. spiralis en el ratón a dosis de 20mg/kg /día/5días con una efectividad de ABZ 46% y FBZ 99.4%. Rossignol¹⁸ muestra en estudios realizados en Europa, Este de África y Asia, que el ABZ a dosis única de 400mg presenta un amplio espectro antihelmíntico en el control de infecciones graves causadas por nemátodos. Sebastia¹⁹ muestra la eficacia de la Ivermectina (IVM) presentando varios estudios realizados por otros autores con un 93% de efectividad en escabiosis, 73% en pediculosis, 96% en oncocercosis con tratamiento de 2 meses, y observa resultados del tratamiento en estrongiloidosis con un 96% de reducción parasitaria en comparación con el tratamiento de ABZ que presenta un 45% de efectividad. Sobre la Nitazoxanida (NZX) se han elaborado varias investigaciones donde se menciona la efectividad de este fármaco, Eguiza⁶, menciona una eficacia global tanto de helmintos como de protozoarios y aun en formas múltiples o mixtas con un 85 y 97% y justifica su uso por el alto nivel de eficacia, gran margen de seguridad, amplio espectro, tolerabilidad y aceptación, facilidad de manejo y bajo costo, recientemente Fonseca⁸, publica un estudio sobre el efecto de la NZX en T. spiralis in vitro e in vivo en modelos experimentales encontrando, una buena eficacia.

En este estudio surge la pregunta: ¿Cuál de los 3 fármacos a prueba en la infección por T. spiralis en ambas fases, es más efectivo?

Objetivo general

Evaluar la carga parasitaria y comparar el efecto del Albendazol, la Ivermectina y la Nitazoxanida en fase intestinal y muscular contra T. spiralis en modelo experimental suino.

Material y metodo

Se utilizaron 18 cerdos de la raza York, de 18 semanas de edad, hembras y machos, 9 en fase intestinal y 9 en fase muscular.

Fase intestinal

El modelo experimental consistió en 9 cerdos hembras y machos, infectados con T. spiralis, en dosis de: 10 LI por gramo de peso, el tratamiento se implementó a los 5 días post-infección, se sacrificaron 40 días después del tratamiento; fueron divididos en cinco lotes:

- 1° .-1 cerdo control sano
- 2°.- 2 cerdos como control infectados
- 3°.- 2 cerdos infectados y tratados con albendazol a dosis de 400mg/día/3 días
- 4°.- 2 cerdos infectados y tratados con ivermectina en dosis única de 200ug/kg
- 5°.- 2 cerdos infectados y tratados con nitazoxanida a dosis 400mg/c/12 hrs. /3días

Sangrándolos en 4 ocasiones (preinfección, post infección, postratamiento, pre sacrificio); obteniendo suero para determinación de la respuesta inmune por medio de técnicas indirectas (Inmunodifusión doble (IDD) e Inmunolectroforesis (IET) y una vez sacrificados, se les implementaron las técnicas directas para evaluar la carga parasitaria. Cuadro 1.

Modelo experimental	Grupo	Número de animales	Sexo	Fase de Infección	Tratamiento (dosis)	4 Sangrados
Cerdo						
Control sano	1y 6	2	♀♂	Intestinal Muscular	Ninguno	1° antes de la infección
Control infectado	2 y 7	4	♀♀	Intestinal Muscular		
Tx albendazol	3 8	2 2	♀♂ ♀♀	Intestinal Muscular	400mg/día/3días 400mg/día/15días	2° después de la infección
Tx itazoxanida	4 9	2 2	♀♂ ♀♀	Intestinal Muscular	7.5 mg/kg/c 12 h/3días 7.5 mg/kg/c 12 h/7días	3° después del tratamiento
Tx ivermectina	5 10	2 2	♀♂ ♀♀	Intestinal Muscular	200µg/kg/dosis única	4° antes del sacrificio

Tx- tratamiento, ♀- Hembra, ♂- Macho

Fase muscular

Consistió en 9 cerdos hembras, infectadas con T. spiralis, en dosis de: 10 LI por gramo de peso el tratamiento se implementó a los 40 días post-infección, se sacrificaron un mes después del tratamiento; fueron divididas en cinco lotes:

- 1° .-1 cerdo control sano
- 2°.- 2 cerdos control infectado
- 3°.- 2 cerdos infectados y tratados con albendazol a dosis de 400mg/día/15días
- 4°.- 2 cerdos infectados y tratados con ivermectina en dosis única de 200ug/kg
- 5°.- 2 cerdos infectados y tratados con nitazoxanida a dosis 400mg/ c/12 hrs. /7días

Sangrándolos 4 ocasiones (preinfección, post infección, postratamiento, pre sacrificio); obteniendo suero para determinación de la respuesta inmune por IDD e IET por medio de técnicas indirectas y una vez sacrificados, se les implementó las técnicas directas para evaluar la carga parasitaria.

Como ya se mencionó, se obtuvo suero para determinación inmunológica por las técnicas de IDD e IET, al sacrificio de los animales, se les realizaron las técnicas directas de compresión, digestión artificial, tinción con azul tripano y tinción con Hematoxilina-eosina (H/E), para evaluar el efecto antiparasitario de los tres fármacos en el modelo experimental.

Sangrado de los animales

Los animales fueron sangrados antes de infectarlos, posterior a la infección, después de la aplicación del tratamiento con fármacos y antes del sacrificio, previamente fueron anestesiados con vapores de halotano y se obtuvieron muestras de sangre, se separó el suero para la realización de IDD e IET.

Infección, tratamiento y sacrificio de los animales

Los animales fueron puestos a dieta sólida 24 horas antes de la infección, se les administró el paquete de carne infectada con 10 LI por gramo de peso mezclada con alimento de manera individual. Trascorridos 5 días, después de la infección a los cerdos de la fase digestiva, se les administró por vía oral, Albendazol (ABZ) (Sector Salud) a dosis de 400 mg al día por tres días consecutivos, se les administró, Nitazoxanida (NZX) (Daxon® Columbia) a una dosis de 7.5 mg/kg/c 12 horas /3 días por vía oral e Ivermectina (IVM) SC. 200µg/kg a dosis única (Iverful® Aranda). Para la fase muscular el tratamiento fue de la siguiente forma: trascorridos 40 días, después de la infección se les administró por vía oral Albendazol (ABZ) (Sector Salud) a dosis de 400mg/día por quince días consecutivos, Nitazoxanida (NZX) (Daxon® Columbia), dosis de 7.5mg/kg/c 12 horas / 7días por vía oral e Ivermectina (IVM) SC. 200 µg/kg a dosis única (Iverful® Aranda).

Para el sacrificio de los animales: se anestesiaron con Pentobarbital®, previa tranquilización con Sural®, se realizó punción cardíaca, a la muerte se despielaron, evisceraron y se realizaron cortes de músculos y órganos para técnica de compresión, fijación de formol y técnica de digestión artificial.

Técnica de compresión de placa

Para la técnica de compresión en placa se utilizaron aproximadamente 50 miligramos de cada tejido, (masetero, lengua, intercostales, diafragma y pierna), cada muestra se colocó entre 2 laminillas y se comprimió, ocupando una área de 1cm x 0.5cm, se observaron al microscopio óptico, con el lente 10x, y se realizó el conteo de 10 campos, por triplicado^{4,7}.

Técnica de digestión artificial

Se utilizaron muestras de 30 g. de cada tejido (masetero, lengua, intercostales, diafragma y pierna), cada muestra se incubó a 37°C, en un tamiz de tul en forma de saco, suspendido en una solución al 0.3% de pepsina (10,000 U) y HCl al 37% (0.2M) en 500 ml de agua destilada, dentro de un embudo de separación; trascorridas 24 horas se procedió a separar el paquete larvario con las LI, que se depositaron en el fondo del embudo, se observaron en una cámara de newbawer al microscopio óptico con lente 10x⁴ y se cuantificó el paquete.

Para la realización de las técnicas indirectas previamente se obtuvo del antígeno soluble total de *Trichinella spiralis*.

Para la obtención del antígeno se sacrificaron 4 ratas infectadas y se obtuvo tejido el cual se sometió a digestión por 24 horas a 37°C según el método descrito por Del Río et al en 1986⁴, en donde se colocó (aproximadamente) 60gr de tejido en un tamiz de tul, en forma de saco; en suspensión de

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; después de 24 horas se procedió a separar las LI que se depositaron en el fondo del embudo, las cuales, después de varios lavados con solución básica de fosfatos (PBS), se desengrasaron con acetona absoluta a evaporación y se mantuvieron en PBS, luego se sonicaron con la finalidad de romper cutícula y vaciar el contenido antigénico de las LI, se centrifugaron a 3500 rpm por 1.5 horas, el sobrenadante fue el antígeno soluble total (AST) mismo que se usó como antígeno para las diferentes pruebas en el modelo experimental con los sueros problema.

La determinación de proteínas se realizó para saber la concentración de éstas, se obtuvo una curva estándar usando Albúmina Sérica Bovina, según la metodología de Bradford 1976², 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%. Se interpoló el valor de la densidad óptica del antígeno, a la de la curva estándar de albúmina, se obtuvo la concentración de proteínas contenidas en los dos tipos de extracto antigénico.

Para fijación del antígeno se realizó el corrimiento electroforético en Geles de Poliacrilamida (EGPA), para esta técnica se usaron geles de 8 x 10 cm, preparados con dodesil sulfato de sodio (SDS), en condiciones reductoras según lo propuesto por Laemmli en 1970¹², con una concentración al 11% del gel separador y del 4% en el concentrador.

A cada carril se le colocaron 40 mL del antígeno, equivalente a una concentración de 36 mg 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; DSS al 2%; azul de bromofenol al 0.5%, etilen diamin tetra acético(EDTA); agua (H₂O); di-tiotreitol 5 Mm y 2-b -mercaptoetanol al 5%.

El corrimiento se realizó en una cámara de Protean II xi Cell (Bio-Rad), 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 gel restante se usó para transferencia a papel de nitrocelulosa (NC).

Se realizó la IDD, para esto se elaboró un gel de agar al 1% en agua destilada con 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, procurando una equidistancia de 0.5 cm. entre pozo y pozo; la confrontación se realizó colocando siempre el antígeno en una cantidad de 20 mL (18 mg) en el centro y, en torno a éste, un suero de reactividad conocida, (en la misma proporción en volumen sin diluir), dejando a temperatura ambiente en cámara húmeda de 24 a 48 horas, hasta observar líneas de precipitación entre el suero positivo y el antígeno. Luego se procedió a teñir el gel con azul brillante de Coomassie G 250, en un 25% en volumen¹⁶.

El producto obtenido del corrimiento en gel de poliacrilamida se transfirió a papel de NC para la realización de la Inmuno-

electrotransferencia (IET), de acuerdo a lo descrito por Towbin²⁰, 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. En 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 del ancho aproximado de cada carril (0.5 cm.).

Transcurrido lo anterior, se procedió a cubrir cada tira con una solución de PBS- leche en polvo 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 hrs. con los sueros de los cerdos en una dilución de 1:100 en PBS- leche en polvo al 3% a 37°C con agitación constante, posteriormente se lavaron en dos ocasiones con PBS- Tween 20 al 0.3% por 10 min. y tres más con PBS otros 10 min. A continuación se incubaron con el segundo anticuerpo Anti-IgG de cerdo, conjugado con peroxidasa 1: 2000 PBS- leche en polvo al 3% por 1 hrs., 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´ di amino – benzidina (DAB), 50 µg en 100 mL de PBS, usando, como sustrato, peróxido de hidrógeno al 37 %.

Las muestras de tejido se sometieron a la Tinción con Hematoxilina-Heosina. El tejido se conservó en formol al 10% para cortes histológicos, con el fin de determinar las características por una tinción de Hematoxilina_Eosina (HE)¹². Los tejidos se deshidrataron para procesarlos en parafina, esto fue llevado a cabo en un procesador de tejidos (Lipshaw Automatic Tissue Processor).

De las muestras observadas en la compresión de tejidos se tomaron y se sumergieron en una sustancia preparada con azul de tripano por 3 a 4 horas, se observaron nuevamente y se analizó si el colorante profundía en la Larva infectante o no, evidenciando así la viabilidad.

De cada uno de los animales sanos, infectados y tratados, se tomó tejido y se administró a tres ratas para la reproducción del ciclo vital de la Trchinellosis, cumplido el ciclo estas se sacrificaron y se observó la presencia o no de larvas infectantes (cuadro 2).

Cuadro 2 - Resultados	Fase Intestinal y muscular		Fase Intestinal						Fase Muscular							
	Control sano	Control infectado	Tx ABZ		Tx IVM		Tx NZX		Tx ABZ		Tx IVM		Tx NZX			
Sexo de los cerdos	♂	♀	♀	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♀	♀	♀	♀	♀	♀
Compresión de Tejido	0	0	7.18	10.63	0.023	0.009	0.90	1.73	2.21	1.21	1.15	0.58	0.52	0.25	0.39	0.38
Digestión Artificial	0	0	3900	5600	850	0	2000	2250	3000	750	0	0	750	125	250	250
Viabilidad por tinción con azul tripano	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
IDD	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IET	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reproducción del ciclo vital en ratas	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Promedio de los resultados, en las técnicas empleadas.

♂- Macho, ♀- Hembra, Tx- Tratamiento, ABZ- albendazol, IVM-ivermectina,

NZX-nitazoxanida,

IDD- Inmunodifusión doble, IET- Inmunolectrotransferencia

(-) Negativo (+) Positivo

Modelo estadístico

Para el modelo estadístico se estableció un experimento bajo un diseño de tratamientos factorial y un diseño experimental completamente al azar, los factores bajo estudio fueron: A: Técnica que tiene 2 niveles¹- conteo de larvas por compresión de tejido y (2)- conteo de larvas por digestión artificial y el factor B: Infección, con 10 niveles: a)- control sano en FI, b)-Control infectado en FI, c)-Tx ABZ en FI, d)-Tx NZX en FI, e)-Tx IVM en FI, f)- control sano en FM, g)-Control infectado en FM, h)-Tx ABZ en FM, i)-Tx NZX en FM y j)-Tx IVM en FM, En cada uno de los músculos que son 5 (lengua, masetero, diafragma, intercostales y pierna), en dos repeticiones por tratamiento resultando 200 tratamientos por ensayar. El modelo lineal asociado al diseño de tratamientos expuesto, fue de la siguiente forma.

$$Y_{ijk} = M + \Delta_i + \beta_j + \Delta_i\beta_j + \xi_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor observado en la k-esima repetición, del j-ésimo nivel del factor B (infección) para el i-ésimo nivel del factor A (técnica).

M = Media general de todo experimento.

Δ_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A

β_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor B

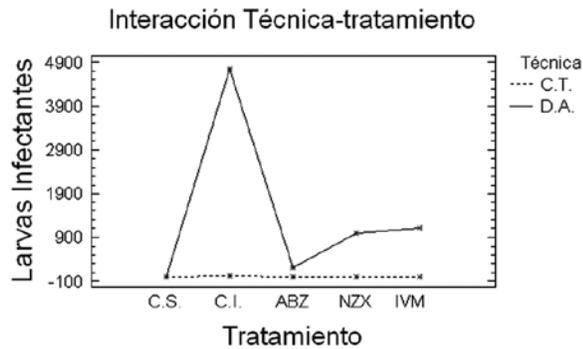
$\Delta_i\beta_j$ = Efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel del factor B con el i-ésimo nivel del factor A.

ξ_{ijk} = Error aleatorio asociado a la k-ésima repetición del j-ésimo nivel del factor B con el i-ésimo nivel del factor A.

Los animales fueron asignados aleatoriamente a cada tratamiento. El número de cerdos en cada grupo no varió con una constante de 2. Las variables bajo estudio fueron: Número de larvas en tejido y en digestión artificial. El programa utilizado para el análisis de los resultados fue Statgraphics Plus 5.1.

Resultados

En el análisis de los resultados observamos que la técnica de compresión de tejidos no mostró sensibilidad a nuestro estudio estadístico en ninguno de los tratamientos, mientras que la técnica de digestión artificial si mostró sensibilidad (gráfica 1). En esta grafica además se observan los resultados de los diferentes tratamientos, donde nos muestra que los cerdos tratados con ABZ en fase intestinal como en fase muscular presentan muy baja carga parasitaria, en el cuadro No. 2 observamos que en fase muscular no presentó larvas por la técnica de digestión artificial, mientras que por la técnica de compresión presenta un número de larvas, solo que estas presentaron un aspecto aparentemente necrótico por tanto muestra una eficacia del 100%.

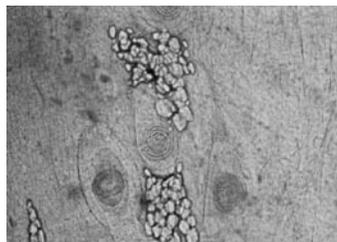


C.S.= Control sano, C.I.= Control infectado, ABZ= Tratados con Albendazol, IVM= Tratados con Ivermectina, NZX= Tratados con Nitazoxanida, C.T.= Compresión de Tejido, D.A.= Digestión artificial.

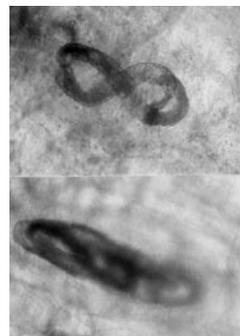
En esta gráfica se muestra la interacción de la técnica con el tratamiento en el conteo de larvas infectantes y nos dice que la técnica de Compresión de tejido (línea punteada), no es sensible al modelo estadístico, sin embargo la técnica de Digestión artificial (línea continua), si muestra sensibilidad.

Observamos la interacción de la técnica con el tratamiento, demostrando como el grupo control sano parte de cero número de larvas, mientras que en el grupo control infectado presenta un alto número de larvas infectantes, a continuación los tratados con ABZ los cuales presentan menor número de larvas mostrando alta efectividad y enseguida con promedio de más de 900 LI los tratados con NZX y los tratados con IVM un número creciente en relación a la NZX.

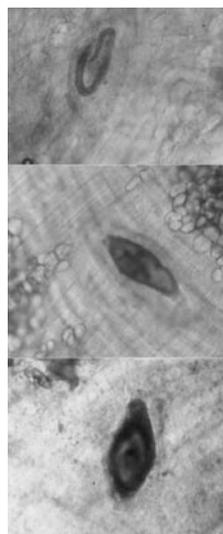
Como se mencionó al evaluar las características de la Célula Nodriz en los cortes de tejido para la técnica de compresión, las que fueron tratadas con ABZ en fase muscular a diferencia de los demás tratamientos (Fotografía 1), presentaban un aspecto aparentemente necrótico (Fotografías 2 y 3). Al realizar la técnica de viabilidad con azul tripano, en el tejido tratado con ABZ en fase muscular, se observó que ingresó y se difundió el colorante mostrando que no es viable (Fotografía 4), en comparación a otros tejidos tratados con IVM y NZX (Fotografías 5 y 6) donde el colorante no siguió el mismo esquema. Así mismo, en la tinción de Hematoxilina-Eosina se observó una gran cantidad de polimorfo nucleares consumiendo el material necrótico, y otra célula en proceso de resolución (Fotografía 7). Se observa en la gráfica 1, como le sigue en efectividad al ABZ, la NZX y al final la IVM.



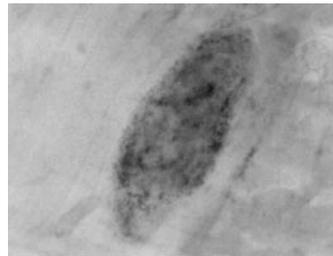
Fotografía No.1.- Corte de tejido tratado con Ivermectina en fase muscular



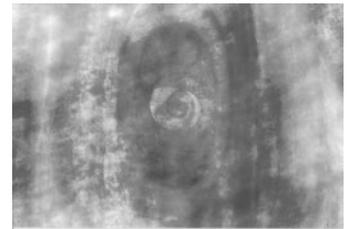
Fotografía No. 3.- Corte de tejido tratado con Albendazol en fase muscular



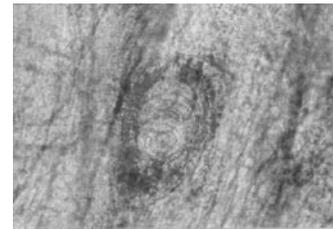
Fotografía No. 2.- Corte de tejido tratado con Albendazol en fase muscular



Fotografía No. 4.- Célula nodriz tratada con ABZ en fase muscular, teñida con azul de tripano

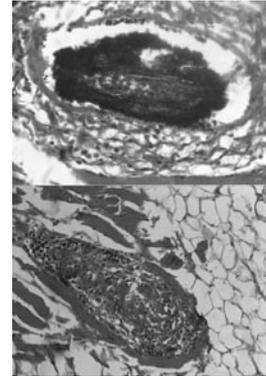


Fotografía No. 5.-Célula nodriz tratada con IVM en fase muscular, teñida con azul de tripano



Fotografía No. 6.- Célula nodriz tratada con NZX en Fase muscular, teñida con azul de tripano.

ABZ- albendazol, IVM-ivermectina, NZX-nitazoxanida, A de T- azul de tripano.



Fotografía No. 7.- Cortes de tejido con la aplicación de la técnica de hematoxilina-eosina, donde se observa una larva necrótica y la siguiente con presencia de abundantes polimorfo nucleares

Al administrar una porción de tejido tratado a ratas para observar la reproducción del ciclo vital, al sacrificio de estas, no se encontró ninguna célula nodriz, demostrando que no hubo infectividad, o reproducción del ciclo vital (cuadro 2).

Al análisis estadístico (ANOVA) nos muestra que tanto la interacción técnica-fase como técnica-tratamiento son estadísticamente significativas al igual que los efectos Técnica (compresión de tejido y digestión artificial), Fase (intestinal y muscular) y los 10 tratamientos utilizados (C.S., C.I., ABZ, NZX, IVM). Con un p -value < 0.01, con un 99% de intervalo de confianza (prueba de Tukey).

Discusión

La Trichinellosis es una zoonosis endémica en nuestro estado (Zacatecas, México), por lo tanto es de vital importancia el estudio de tratamientos adecuados en la etapa digestiva y muscular de esta enfermedad, actualmente existen muy pocos fármacos eficaces. En Zacatecas existe una alta incidencia tanto en animales como en personas, lo que ha preocupado a clínicos e investigadores en la búsqueda de tratamientos específicos^{1,3,7,14,15,22}.

Los cerdos en este estudio presentaron los signos característicos atribuidos a la enfermedad como pelo hirsuto, dificultad y disminución a la movilidad, diarrea característica de la respuesta celular a la infección, controlada por la respuesta inmune del huésped¹¹, edema peri orbital y fiebre.

A la electroforesis presentaron el triplete característico de *T. spiralis* que oscila entre 42, 45 y 48 kDa²¹, siendo más marcado el de 43 kDa^{4,5}, como se muestra en la figura 1.

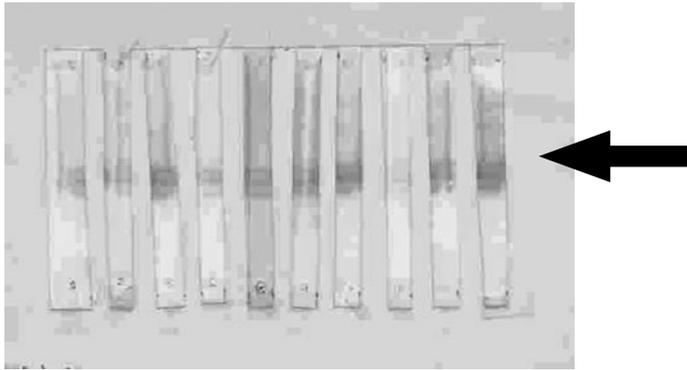


FIGURA No. 1. Inmunoelctrotransferencia con el triplete característico de 42, 43 y 45 kDa, señalado con la flecha.

Es de gran importancia la magnitud del problema ya que puede pasar de manera desapercibida el consumo la carne de cerdo infectado y la infección misma, puesto que es frecuente la practica de la matanza clandestina para su consumo. Uno de los fármacos utilizados ha sido el Tiabendazol en humanos³, sin embargo, debido a su toxicidad relativa el empleo ha disminuido en seres humanos⁹. En un experimento realizado en cerdos, a los 6 y 14 días después de la infección con Flubendazol¹⁴ se encontró un 100% de efectividad en parásitos adultos es decir, en fase intestinal. Es importante encontrar el fármaco efectivo para evitar la infectividad al humano y así mismo, para aplicarse como tratamiento al hombre.

El ABZ es recomendado en ayunas para efecto en fase intestinal y administrado con alimentos para los parásitos tisulares, ya que se mejora su absorción¹⁰, y es de los benzimidazoles el menos toxico, Rossignol¹⁸ encontró buen efecto contra nematodos y menciona que es empleado mundialmente.

La Ivermectina es otro antiparasitario que ha venido a revolucionar los tratamientos debido a su facilidad de administración en dosis única, su amplio espectro, tolerancia, baja toxicidad y bajo costo¹⁹. Presentando en nuestro estudio el menor efecto farmacológico en fase digestiva y en la muscular mejor efecto que la nitazoxanida, de manera distinta a lo encontrado por Sebastiao en el 2002¹⁹, quien encontró contra la nematodiasis una eficiencia del 99.3%.

Algunos autores recomiendan ampliamente la nitazoxanida en infecciones provocadas por nematodos^{6,8}, en nuestro estudio se encontró mayor efecto cuando fue aplicado en fase muscular que en fase intestinal, pero su acción en esta parasitosis no es totalmente efectiva ya que disminuye la carga parasitaria pero no elimina totalmente a *T. spiralis*, continuando siendo viable el parásito y se reproduce el ciclo vital.

En los resultados encontrados a la electroforesis presentaron el triplete característico de *T. spiralis* que oscila entre 42 y 48 kDa²¹, siendo el más marcado el de 43 kDa (figura 1), datos similares a los obtenidos por Del Rio en 1986⁴ y Despommier en 1998⁵.

Según el diseño experimental empleado esta investigación muestra que la técnica de compresión de tejido no es sensible estadísticamente mientras que la de digestión artificial si lo es, contrario a lo presentado por Ribichi en el 2000¹⁷, quien menciona que la digestión artificial para el diagnóstico es mas sensible en cargas parasitarias bajas, contrario al diagnóstico en animales con cargas parasitarias altas, es de-

cir, mas de 500 LI, pero no presenta diferencias significativas con el método de compresión de tejido en triquinoscopio. Es importante mencionar que el estudio de conteo de larvas en campos por la técnica de compresión de tejido, lo realizamos en microscopio óptico al 10x que a diferencia del triquinoscopio es mas alta su resolución.

Resultando muy importante y trascendente la efectividad del 100% del albendazol administrado en fase muscular y la disminución de la carga parasitaria aplicado en la fase intestinal.

Es importante sin embargo tener presentes las acciones profilácticas que se deben llevar a cabo, como: evitar el consumo de carne mal cocida por los humanos. Vigilar la crianza de los cerdos, inspeccionar algunos cortes en los mataderos (diafragma, masetero y lengua). En caso de infección elegir el fármaco que presente baja toxicidad y alta eficiencia terapéutica, como el albendazol.

Conclusión

El antiparasitario que presentó un mayor efecto fue el albendazol en fase muscular con cambios en la célula nodriza y la no reproducción del ciclo vital de *T. spiralis*, por tanto la posología establecida en este estudio para esta fase es efectiva 100% en el cerdo. En fase intestinal, existe disminución de la carga parasitaria pero los parásitos siguen siendo viables e infectivos, quizás se requiera que en esta fase se prolongue los días de tratamiento, con la misma dosis.

Referencias

1. Chung MS, Joo KH, Quan FS, Kwon HS and Cho SW (2001) Eficacy de flubendazole and albendazole against *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite*. 8: 195-198.
2. Bradford H, Laccetti A (1981) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
3. Casali AJ, De Costa SW (1977) Investigación clínica y anatomopatológica del tratamiento de la triquinosis aguda con tiabendazol, Sistema Nacional Integrado de Salud. San Luis (Republica de Argentina), *Bol. Chile, Parasit.* 32: 66-70.
4. Del Río A, Herrera DR, Herrera R (1986) Triquinosis experimental: extracción de antígenos y procedimientos para detectar anticuerpos. *Archivos de Investigación Médica. México.* 17:359-367.
5. Despommier D D (1998) How does *Trichinella spiralis* Make Itself at home. *Parasitology Today.* 14 (8)318-323.
6. Eguiza SL (2000) La Nitazoxanida y los Niños. Carta al Editor. *Revista Mexicana de Pediatría.* 67:2: 89-90.
7. Frago RS (1981) Un brote de triquinosis en Villanueva, Zacatecas. *Salud Publica de México. Epoca V,* 13:1 : 25.
8. Fonseca S F, Martinez G M, Martínez AR (2003) Nematocidal activity of nitazoxanide in laboratory models. *Parasitol Res.* 91: 321-324.
9. Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R, Goodman-Gilman A (1996) Las bases farmacológicas de la terapéutica. Volumen

- II. 9º edición, Editorial MC Graw_hill Interamericana, p.1077 y 1081.
10. Hardman J, Limbbird L, Molinoff P, Ruddon R, Goodman-Gilman A (2002) Las bases farmacológicas de la terapéutica. Volumen II. 10º edición, Editorial MC Graw_hill Interamericana, p. 1138 a 1149.
 11. Kroc CJ, Wasson DL, Abramson JE, David CS (1983) Cloned T cell recognize *Trichinella spiralis* antigen in association with an IgE restriction element, *Inmunogenetics*, 18:435.
 12. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680.
 13. Manual of Histology and special staining technique (1957) Armed Forces. Institute of Pathology. Washington, D.C Chapter 2, p.57-16.
 14. Marincūlic A, Fajdiga M, Durakovic E (2001) The efficacy of flubenda zole against *Trichinella spiralis* in swine. *Parasite*. 8: 191-194.
 15. Moreno MA, Vacio MR, Reveles RG, Muñoz JJ (2001) Epidemiología de *T. spiralis* en el Estado de Zacatecas, México. *Jornal Brasileiro de parasitología*. Vol. 37 No.4: 57.
 16. Ouchterlony O, (1958) Diffusion in Gel Methods for Immunological Analysis in: *Progress Allergy*. Vol. V. Ed. Gallio, P., Basel and New York, Krager, New York, USA, p. 1 – 78.
 17. Ribicich M, Rosa A, Molina V, Blangiardi G, Basso N, Franco A (2000) Comparación entre la Digestión Artificial y la triquinoscopia para la detección de *Trichinella spiralis* en carne pocina., *InVET*. VOL. 2, No. 1, p. 81-85.
 18. Rossignol JF, Coulaud JP (1983) Evaluation de albendazole in Europa, West the Africa and Asia as a single dose anthelmintic: report 1455 patients, *Summary of Clinical Trials Worlwide*, p.24- 25.
 19. Sebastião AP (2001) Sampaio Laboratorios Sintofarma Monografía IVERMECTINA, San Paulo Brasil.
 20. Towbin HT, Sthanlin T (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulosa sheets, procedure an some application. *Proct. Nathl. Acado Sci. USA* 76: 4350.
 21. Venturiello SM (1995) FAO40 Mecanismos efectores de inmunidad en Triquinosis y su regulación. *GMC Treatment Issues* Vol. 9. 9:1453 lines.
 22. Yépez-Mulia L, Morales HR, Viveros GN, Cedillo RR, Hernández LF, Castillo R et al, (1999). Evaluación of Albendazole Prodrugs in Experimental Trichinellosis, *ELSEVIER, Archives of Medical Research* 30: 368-37