

Utilidad de la HPLC en la purificación de proteínas específicas de los productos de excreción secreción de *Trichinella spiralis* y su posible utilidad en el diagnóstico

María de Lourdes Galíndez ^{1a}, Roberto Vázquez ^{1a,c}, Juan Carlos Carpio ^{2b}.

^a Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Anáhuac México Norte, Huixquilucan, Estado de México, México. CP: 52786.

^b Departamento de Parasitología. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, CDMX, Ciudad de México, México. CP: 01480.

^c Coordinación de Enfermedades Emergentes y Urgencias. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, CDMX, Ciudad de México, México. CP: 01480.

¹ Primeros autores

² Autor de correspondencia: Juan Carlos Carpio, Departamento de Parasitología. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, CDMX, Ciudad de México, México. CP: 01480.

juan.carpio@salud.gob.mx.

Resumen

La triquinelosis por *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) es una zoonosis parasitaria que comienza en el tracto digestivo, sin embargo, las larvas de este parásito consiguen enquistarse en tejido muscular, donde pueden provocar complicaciones graves. Es considerada un problema sanitario a nivel mundial y en México se desconoce su distribución, habiendo casos esporádicos y brotes.

En el presente artículo se busca abordar la problemática de su diagnóstico, ya que causa síntomas inespecíficos. El diagnóstico serológico se realiza mediante ELISA como método presuntivo (por su sensibilidad y reacciones cruzadas con otros parásitos) y WB como método confirmatorio. En ambos métodos se utilizan los llamados productos de excreción-secreción (PES), que son un conjunto de glicoproteínas obtenidas del cultivo del parásito. Las glicoproteínas de 44, 49 y 55 kDa, reconocidas mediante WB son consideradas específicas y por lo tanto diagnósticas.

El objetivo del presente trabajo es recopilar información que permita establecer un precedente para determinar la utilidad de la HPLC como metodología para la purificación de las glicoproteínas 44, 49 y 55 kDa de los productos de E-S del parásito. Con la finalidad de que esta metodología apoye el desarrollo de un ELISA específico para la detección de casos por *T. spiralis*.

Este artículo tiene como objetivo la revisión de la literatura hasta la fecha en el uso de HPLC en la purificación y separación de los PES de *T. spiralis*.

Palabras clave: *Trichinella spiralis*, antígenos ES, triquinelosis, diagnóstico, tratamiento

Abstract

Trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) is a parasitic zoonosis that begins in the digestive tract, however, the larvae of this parasite manage to encyst in muscle tissue, where they can cause serious complications. It is considered a worldwide health problem and in Mexico its distribution is unknown, with sporadic cases and outbreaks.

This article seeks to address the problem of its diagnosis, since it causes non-specific symptoms. Serological diagnosis is made by ELISA as a presumptive method (due to its sensitivity and cross-reactions with other parasites) and WB as a confirmatory method. In both methods, the so-called excretion-secretion (E-S) products are used, which are a set of glycoproteins obtained from the culture of the parasite. The 44, 49 and 55 kDa glycoproteins recognized by WB are considered specific and therefore diagnostic.

The objective of this work is to collect information that allows establishing a precedent to determine the usefulness of HPLC as a methodology for the purification of glycoproteins 44, 49 and 55 kDa from the E-S products of the parasite. In order for this methodology to support the development of a specific ELISA for the detection of cases by *T. spiralis*.

This article aims to review the literature to date on the use of HPLC in the purification and separation of PES from *T. spiralis*.

Key words: *Trichinella spiralis*, ES antigens, trichinellosis, diagnosis, treatment.

Introducción

Trichinella spiralis (*T. spiralis*) es un nematodo intracelular muscular con la capacidad de infectar una gran variedad de mamíferos, entre ellos se encuentra el ser humano (Yang, Y. et al., 2019; Han, C. et al., 2019; Pearson, R. D., 2019). Este parásito es un gusano redondo cuya parte anterior del cuerpo contiene una estructura denominada esticosoma, que se ha demostrado se encuentra asociada a la producción de polipéptidos antigénicos, o bien, productos de Excreción-Secreción (PES). Como se muestra en la figura 1, la hembra mide entre 3 y 4 mm de longitud, a comparación del macho que cuenta con 1.3 a 1.5 mm de longitud y en su extremo posterior tiene dos apéndices caudales lobulares (Uribarren, T., 2018; INSHT., 2013).

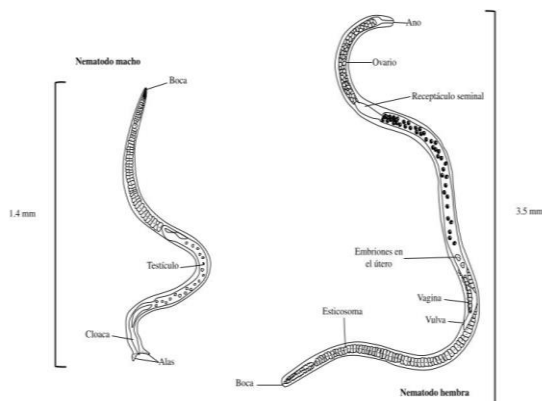


Figura 1. Anatomía del nematodo macho y hembra *T. spiralis*. Modificada por los autores de B. C., 2022.

Triquinelosis

La infección por *T. spiralis* está catalogada no únicamente como un problema de salud pública, sino también se considera una afección importante a la economía al ser una cuestión de seguridad alimentaria. Está considerada dentro del grupo de las enfermedades emergentes y reemergentes. Es una infección que está presente en 66 países y entre 1986 a 2009 han reportado 65,818 casos y 42 muertes en 41 de estos países (Sun et al., 2019).

Esta parasitosis es adquirida al ingerir alimentos contaminados con quistes del parásito; muy comúnmente se encuentra

presente en la carne cruda o mal cocida. Se ha reconocido que la fuente más común de dicha zoonosis es la carne de cerdo (Franssen, F. et al., 2019; Gondek, M. et al., 2018).

El ciclo de vida de *T. spiralis*, ejemplificado en la figura 2, se desarrolla en su huésped en tres fases principales: larva recién nacida, larva adulta y larva muscular (Sun et al., 2019; Qi X et al., 2018). Al entrar al tracto digestivo, las larvas alcanzan el intestino delgado donde crecen para convertirse en larvas adultas. Éstas se reproducen, generando así la presencia de larvas recién nacidas, las cuales migran por el sistema circulatorio hacia el sistema músculo-esquelético, donde se enquistan en cápsulas de colágeno y pueden permanecer de forma latente por años (Sun et al., 2019; Hernández-Ancheyta L. et al., 2018).

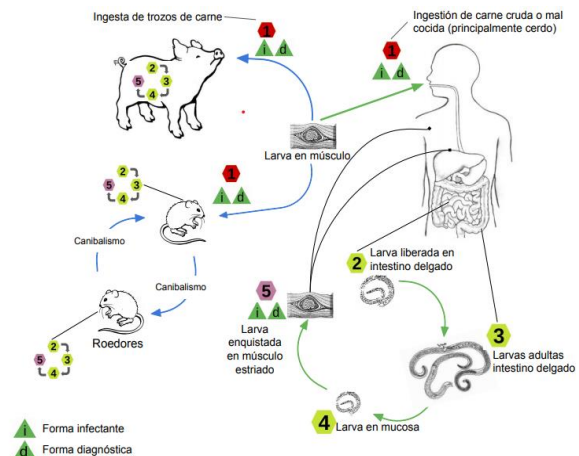


Figura 2. Ciclo de vida de *Trichinella spiralis*. Modificada por los autores de CDC, 2019.

Productos de Excreción y Secreción (PES)

Los PES son polipéptidos generados en el esticosoma, organelo secretor de *T. spiralis*.

Se ha descrito que las proteasas que forman parte de los PES presentan diversas funciones durante las infecciones y se ven involucradas en una serie de procesos durante las mismas. Dentro de estos procesos se encuentran: invasión tisular y evasión del sistema inmune del hospedero, nutrición del parásito, procesos de anticoagulación y de

degradación de anticuerpos (Sun et al., 2019; Saboia-Vahia L. et al., 2013).

Estos PES tienen actividad de proteasas entre las cuales se ha podido determinar que, en mayor proporción, están conformados por proteasas de serina (Sun et al., 2019; Hernández-Ancheyta L. et al., 2018; Saboia-Vahia L. et al., 2013; Gao, H et al, 2018). Estas también se han propuesto como objeto de estudio para el desarrollo de vacunas y quimioterapéuticos para el tratamiento de la parasitosis (Sun et al., 2019; Lei et al, 2020). Dichas proteasas pueden ser desactivadas por acción de anticuerpos anti-*T. Spiralis*.

Las proteasas de serina se han identificado en diversas ocasiones dentro de los PES de *T. spiralis* en sus distintas fases de infección. Además, los niveles de expresión de las proteasas de serina son mayores en la fase temprana de la infección que en la de la enquistación en músculo. Estos resultados sugieren entonces que las proteasas de serina deben de participar en la invasión del epitelio intestinal por las larvas infectivas intestinales y en la invasión intestinal (Lei et al, 2020; Gao, H et al 2018).

Se ha llevado a cabo diversos estudios (Han, C. et al., 2019; Jin X. et al., 2019; Sofronic-Milosavljevic L. et al, 2015) donde se ha demostrado que los PES tienen una interacción con células inmunes, enterocitos y células musculares del hospedero. Por la interacción que tienen con células inmunes, se ha podido identificar la inducción e inmunomodulación que estos provocan en el hospedero (Murrell, K. D., 2007, Han, C et al, 2019; Kosanović, M et al 2019). Por medio de la excreción de estos, es que este nematodo es capaz de generar un ambiente que favorezca su supervivencia intramuscular, a través de la modulación de la respuesta inmune (Sofronic-Milosavljevic L. et al, 2015; Li LG. et al., 2015; Cvetkovic J. et al., 2016; Murrell, K. D., 2007).

Esta inmunomodulación se lleva a cabo por la inducción de la respuesta antiinflamatoria cuando linfocitos fenotipo Th2, también considerados T reguladores, células dendríticas con actividad tolerogénica y macrófagos con actividad antiinflamatoria son activados al presentarse los PES (proteína de dominio múltiple similar a cistatina, galectina,

proteasas de serina y RNA helicasa) en el organismo del huésped (Sofronic-Milosavljevic L. et al, 2015; Cvetkovic J. et al., 2016; Hewitson, 2009; Grzelak, 2020). Al inducir esta respuesta antiinflamatoria se promueve la reparación de tejidos dañados y se obstaculiza al desarrollo de enfermedades autoinmunes como encefalomiелitis, diabetes del tipo I, colitis experimental y artritis reumatoide (Cvetkovic J. et al., 2016).

Obtención de PES

Obtención de larvas adultas por digestión enzimática

Para llevar a cabo este tipo de estudios es necesario comenzar realizando el aislamiento de larvas adultas para poder obtener los PES. Para la obtención de estas larvas se debe de contar con ratones que ya se encuentren infectados con el parásito, se toma una muestra de la carne de sus músculos para realizar una digestión enzimática con HCl y pepsina, de esta forma se liberan las larvas del músculo y es posible aislarlas por medio de una serie de lavados y un gradiente de sacarosa. Esto se realiza para, finalmente poderlas llevar a cultivo celular para su mantenimiento y la recolección de sus productos, que son liberados al medio (Medina Flores, Y., 2017).

Recolección de sobrenadante de cultivo celular

Para la obtención del sobrenadante debe de realizarse un cultivo celular *in vitro* de las larvas adultas, en el que de forma continua se realicen cambios de medio. El medio que se retira debe de ser almacenado para poder purificar de ahí las proteínas de interés. Debe procurarse tener bajo un correcto almacenamiento todo el sobrenadante recuperado. Las condiciones pueden ir de su almacenamiento a 4°C o a -20°C (Medina Flores, Y., 2017; Gomaa MM., 2020).

Tratamiento

Los pacientes normalmente acuden por ayuda médica después de varias semanas de la infección aumentando la probabilidad de que la persona infectada ya posea larvas viables presentes o enquistadas en el músculo, las

cuales pueden sobrevivir por años a pesar del tratamiento, provocando una mialgia persistente (Gamble HR et al., 2007; Ambrosioni, J., et al., 2006; Bruschi, F. & Murrell K. D., 2002; Dupouy-Camet, J. et al., 2002; Koci, W., 2000).

Algunos de los antihelmínticos que se utilizan principalmente contra la triquinosis son el albendazol, el mebendazol y el pirantel en humanos; las lactonas macrocíclicas como la ivermectina, abamectina, eprinomectina, doramectina, milbemicina, moxidectina y selamectina se han usado en animales, pero no en humanos (Ambrosioni, J., et al., 2006; Bruschi, F. & Murrell K. D., 2002; Dupouy-Camet, J. et al., 2002; Koci, W., 2000; Food Safety Commission of Japan, 2016; Hamel, D et al, 2017; Milton, P et al, 2020; Peng, R et al 2018, Wang, H et al, 2020). Lo cual marca la importancia de búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de esta parasitosis (Chávez, R., 2006).

Prevención

La triquinosis es una parasitosis que representa una gran problemática, tanto para el sector salud como para el alimentario. Esto se debe a que, para los seres humanos es una infección parasitaria que puede derivar en afecciones más graves de no tratarse a tiempo y correctamente. De la misma manera, es una parasitosis que afecta a otros mamíferos, específicamente a cerdos y debido al amplio consumo de este animal, esta afección implica pérdidas importantes en el sector alimentario. De acuerdo con datos de la OECD (2019), la producción de carne porcina representa una quinta parte de la producción en el sector alimentario en México y es también la segunda proteína animal de mayor consumo después de la carne de pollo (Consejo Mexicano de la Carne, 2022; SENASICA, 2019).

Entre los métodos y regulaciones implementadas por la Organización Mundial de la Salud/OIE/FAO (2017) para evitar el consumo de carne porcina infectada por *T. spiralis* se encuentran:

- Criar a los cerdos en instalaciones adecuadas, en ausencia de roedores.
- Evitar que se alimenten con basura

- Eliminar los cadáveres de cerdos y otros animales para evitar el consumo por estos
- En caso de realizar faena para el consumo propio, realizar análisis de laboratorio previamente
- Tener en cuenta que procesos de conservación de la carne, como lo son la salazón, secado y ahumado, no eliminan al parásito
- Enviar muestras a analizar para descartar la infección.

En México, todas estas regulaciones se encuentran implementadas y vigiladas por el gobierno, bajo el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. Este Reglamento especifica en sus diversos artículos las condiciones de cría, de los establecimientos, producción y venta para asegurar que la carne sea inocua y apta para consumo humano (Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, 2000; Gamble HR et al., 2007).

Las medidas preventivas de esta parasitosis se basan principalmente en la modificación de los hábitos alimenticios de la población (Mayoclinic, 2021; COPRAL, 2015). Dentro de estas medidas se recomienda el consumo de productos cárnicos derivados del cerdo bien cocidos, evitar el uso y consumo de carne cruda, así como el correcto almacenamiento de los alimentos y la verificación de la etiqueta de fabricación de alimentos cárnicos (Mayoclinic, 2021; Pereira A., 2001; COPRAL, 2015).

Para evitar que la triquinosis represente pérdidas importantes, tanto en el sector salud, como en el alimentario; tanto en términos de salubridad, como en términos monetarios, es de gran importancia optimizar los métodos de diagnóstico (OECD, 2019).

Métodos de Diagnóstico

El diagnóstico de la triquinosis se basa en la evaluación clínica y en pruebas serológicas. El diagnóstico clínico de la triquinosis es complicado debido a la falta de especificidad en dichas manifestaciones.

La invasión muscular por las larvas está asociada a signos y síntomas de una respuesta inflamatoria y alérgica. La infección se caracteriza por los siguientes datos clínicos: fiebre, diarrea, edema palpebral o facial, dolor muscular y eosinofilia (Sun GG et al., 2015; Hassona Y. et al. 2015). Es necesario entonces, complementar con métodos parasitológicos, inmunológicos y de biología molecular para tener un diagnóstico específico. (De la Rosa JL., 2000).

Biopsia muscular

La biopsia muscular puede confirmar el diagnóstico (The StayWell Company, 2021), pero es considerada como necesaria en ocasiones muy puntuales, consiste en la obtención de un fragmento de tejido muscular para una posterior observación microscópica a 10X (De la Rosa JL., 2000). Cuando se tiene una coincidencia entre los datos clínicos y la biopsia muscular positiva, el diagnóstico se confirma. Este tipo de diagnóstico es definitivo, sin embargo, es un método poco sensible debido a que no siempre permite un veredicto correcto en infecciones con baja carga parasitaria (Sun GG et al., 2015).

Lo anterior se debe a que la ubicación de los quistes, o bien, de las propias larvas musculares es desconocida y depende de la densidad de parásitos presentes, así como de la habilidad que tengan los médicos para identificar el sitio donde está enquistado el parásito (De la Rosa JL., 2000).

Inmunodiagnóstico

Los métodos de inmunodiagnóstico se denominan de esta manera debido a que son métodos basados en una reacción antígeno-anticuerpo específica en muestras séricas. El propósito de esta reacción es la detección de antígenos, anticuerpos o bien, complejos inmunes circulantes, mediante extractos totales del parásito, muestras sanguíneas, coprocultivos o por medio de antígenos específicos o purificados de la larva muscular (Dimzas, D et al, 2020). Las técnicas de mayor uso son los métodos de ELISA y la inmunoelectrotransferencia (IET) o Western Blot (De la Rosa JL., 2000; Barruet R. et al., 2020). En el caso de la triquinosis, los

antígenos mayormente utilizados para el inmunodiagnóstico son los antígenos de excreción-secreción de larvas musculares.

ELISA

El Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) es considerado como uno de los estudios bioquímicos más importantes y mayormente utilizados para la detección de antígenos o anticuerpos parasitarios. Debido a la versatilidad y reproducibilidad que presenta, es que se ha convertido en la técnica para la detección de antígenos y anticuerpos más utilizada. En este sistema, se utiliza una fase sólida, una microplaca de poliestireno o de nitrocelulosa, donde se adsorbe el antígeno (o anticuerpo) de interés. Una vez fijado, se procede a llevar a cabo las reacciones posteriores para su análisis cualitativo. Las reacciones posteriores constan de la unión y la acción de anticuerpos específicos y enzimas, respectivamente. Los anticuerpos llevan a cabo una unión específica al antígeno, mientras que la enzima debe tener la capacidad de catalizar una reacción, cuya finalidad es generar color al transformar al sustrato (Medina Flores, Yolanda., 2017).

El diagnóstico serológico de triquinosis de primera línea es el ensayo de ELISA indirecto para detección de anticuerpos de *T. spiralis*. Realizar este diagnóstico como primera opción forma parte de las recomendaciones de la Comisión Internacional de Triquinosis (Gamble HR. et al, 1988; Gamble HR. et al., 2004). Sin embargo, este ensayo presenta una importante desventaja: hay una alta tasa de resultados falsos negativos durante la infección temprana. El ensayo también ha mostrado que a escala laboratorio da falsos negativos hasta tres o cuatro semanas después de la infección (Gamble HR. et al., 2004; Oltean M. et al., 2012; Contreras M del C, 2001).

Otra desventaja es las reacciones cruzadas que pueden ofrecer un falso positivo para la triquinosis, pero ser positivo provocado por la reacción con un antígeno de un helminto distinto, usualmente *Echinococcus granulosus*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Schistosoma haematobium*,

Paragonimus estermani y *Clonorchis sinensis* (Wang, L et al., 2013). Este es un caso que se ha visto presente en diversos estudios con helmintos que tienen mayor proximidad filogenética, sobre todo cuando el ensayo se realiza con muestras antigénicas crudas o parcialmente purificadas (Gamble HR. et al., 2004; Oltean M. et al., 2012).

Así, los estuches comerciales de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos IgG anti *Triquinella spiralis* en muestras humanas, indican entre un 94.4% y 100% de sensibilidad y una especificidad entre 93.8% y 94.8%, sin embargo, también reconoce los anticuerpos anti *Ascaris*, *Strongyloides*, *Toxocara* y *Ancylostoma* (Creative Diagnostics, 2022; IBL International GmbH, 2020; Abcam, 2019).

Por lo tanto, el tener antígenos purificados o específicos utilizados para la detección de anticuerpos contra este parásito, permitiría tener una metodología sencilla, reproducible y sobre todo específica a *T. spiralis* en pacientes parasitados.

Inmunolectrotransferencia/Western Blot

La técnica de inmunolectrotransferencia es una de las que presentan mayor utilidad para el análisis antigénico. Es una metodología basada en la combinación del poder resolutivo de la electroforesis en gel de poliacrilamida con las reacciones inmunoenzimáticas en fase sólida (De la Rosa JL., 2000). El proceso de esta técnica comienza con la separación de los PES de una solución según sus pesos moleculares. Posterior a la separación, las proteínas son transferidas a una membrana con la finalidad de que se unan a los grupos reactivos de ésta para una posterior reacción con sus correspondientes anticuerpos (Medina Flores, Y., 2017).

En la membrana se obtiene un patrón, copia de la separación proteica en el gel. En este papel de nitrocelulosa se debe llevar a cabo un bloqueo de los sitios reactivos que quedan libres después de la transferencia y, posteriormente, se procede a la reacción específica antígeno-anticuerpo de la muestra del paciente (De la Rosa JL., 2000; Medina Flores, Y., 2017; Pérez-Chabela, ML et al 2015; Yera H. et al, 2003). Finalmente, se lleva a cabo la detección de estas uniones por

medio de técnicas de actividad enzimática, colorimétricas o de fluorescencia *in situ*.

Se ha podido determinar, en estudios en humanos, cerdos y ratas, las bandas generadas por este ensayo las cuales demuestran el reconocimiento de los anticuerpos en la muestra hacia tres proteínas que son específicas y su peso molecular corresponde a 44, 49 y 55 kDa respectivamente, señaladas en un recuadro en la figura 2. Estos resultados son utilizados como criterio de positividad en el diagnóstico de *T. spiralis* debido a la especificidad que representa esta metodología (De la Rosa JL., 2000).

Mientras que el ELISA es una metodología presuntiva, en la que se obtiene una reacción por la presencia de anticuerpos, Western Blot es un ensayo confirmatorio, ya que éste detecta la presencia de anticuerpos a antígenos específicos de manera precisa, arrojando como resultado la identificación de las tres bandas específicas para las proteínas de interés de *T. spiralis*.

Métodos de Separación

Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas (CL-EM)

Se han realizado diversos estudios para la caracterización de los PES de *T. spiralis*, entre ellos se encuentra la metodología descrita por Grzelak (2020), en el cual se realiza una CL-EM posterior a una separación por electroforesis de dos dimensiones (2D-DIGE). En este estudio seleccionó 196 proteínas de posible interés antigénico, entre ellas se incluyeron proteínas de las especies de *T. spiralis* y *T. bitrovi*, de donde se observó que existen tres proteínas específicas que caracterizan la infección de *T. spiralis*

Del total de las proteínas caracterizadas en el estudio (Grzelak, 2020), dentro del género de *Trichinella*, 32 proteínas fueron reconocidas por su potencial antigénico (descritas en la Tabla 1 con sus respectivas acciones a nivel molecular), y se identificaron 56 proteínas específicas para *T. spiralis*, de las cuales se reconocen 25 asociadas con alguna función molecular, 16 a componentes celulares y 15 a procesos biológicos.

Sin embargo, del total de las proteínas se pudo reconocer que únicamente 28 son expresadas exclusivamente por *T. spiralis*.

Dentro de las 28 proteínas exclusivas de *T. spiralis*, se identifica que la mayor parte se encuentran unidas a nucleótidos, carbohidratos, iones u otras proteínas (Grzelak, 2020). Estas se pudieron categorizar de la siguiente manera:

- 16 proteínas que catalizan procesos hidrolíticos incluyendo actividades de endopeptidasa, endonucleasa y transferasa.
- Cinco proteínas que catalizan reacciones de oxidorreducción o de escisión endonucleolítica por acción de desoxirribonucleasa II.
- Dos proteínas se caracterizaron como metiltransferasas.
- Cinco como participantes del transporte de lípidos o iones, modulando directamente actividad enzimática o iniciando traducción o como coactivadoras de la transcripción.

Finalmente, se seleccionaron las tres que caracterizan a la infección específica del género *spiralis*, las que corresponden a un peso molecular de 44, 49 y 55 kDa (Grzelak, 2020; Robinson, 2007)., las correspondientes a los pesos moleculares de 45, 49 y 53 kDa. Tras la realización de un análisis proteómico, estas proteínas (resaltadas en la Tabla 1) se reconocieron como la proteína de dominio múltiple similar a la cistaina, la subunidad reguladora 7 del proteosoma 26S y una proteína disulfuro isomerasa, respectivamente a los pesos moleculares. (mostradas en la figura 3).

HPLC

La cromatografía líquida (LC) es una técnica de separación física realizada entre dos fases, una fase sólida y una fase líquida. Una muestra se separa en sus componentes constituyentes (o analitos) distribuyéndolos entre la fase móvil (un líquido que fluye) y una fase estacionaria sólida (adsorbentes empaquetados dentro de una columna).

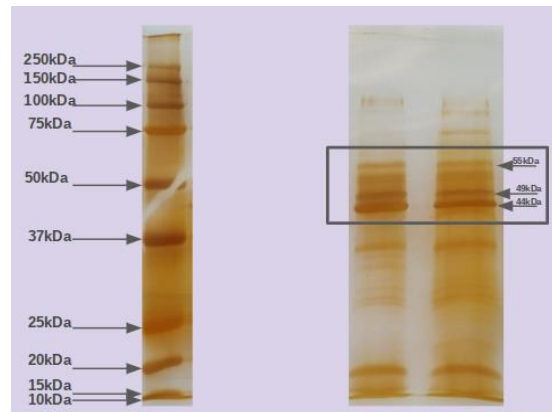


Figura 3. En el lado izquierdo se observa un marcador de peso molecular. Encerrado en un recuadro del lado derecho se observa el triplete de proteínas correspondientes a los PES de interés. La separación de las proteínas fue realizada con 2-Mercaptoetanol

Por ejemplo, el líquido que fluye puede ser un solvente orgánico como el hexano y la fase estacionaria puede ser la partícula porosa de sílice empaquetada en una columna. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una forma moderna de LC que usa columnas de partículas pequeñas a través de la fase móvil.

La figura 4 ejemplifica un esquema del proceso cromatográfico, donde una mezcla de los componentes A y B se separan en dos túneles distintos a medida que migran hacia abajo por la columna empacada (fase estacionaria) mostrando un proceso de mezcla de los analitos entre el líquido y la fase estacionaria unida a una partícula de relleno esférica. Se puede observar que el movimiento del componente B se retiene en la columna porque cada molécula B tiene una mayor afinidad por la fase estacionaria que la molécula A.

HPLC es una técnica de separación versátil con una amplia gama de aplicaciones. La separación de cada entidad química de la mezcla de muestra se basa en sus distintas afinidades hacia el material adsorbente en la columna o la fase móvil, causando varios constituyentes para viajar a diferentes velocidades y separarse. Anteriormente, se denominaba cromatografía líquida de alta presión, ya que depende de bombas de alta presión para permitir una separación más rápida.

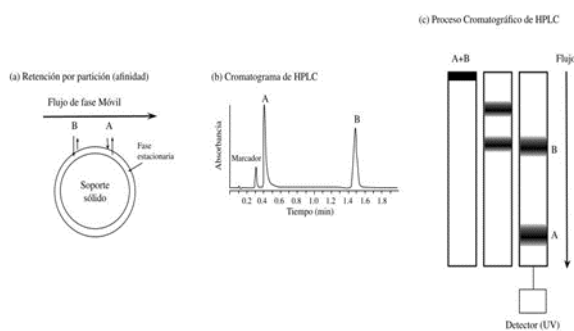


Figura 4. (A) Representación microscópica del proceso de partición para el análisis de moléculas A y B en la fase estacionaria, fijadas a un soporte esférico sólido. (B) Cromatograma que muestra la señal de los componentes A y B mediante el uso de un detector UV. (C) Esquema del proceso cromatográfico mostrando la migración de dos bandas correspondientes a dos componentes en la columna. Modificada por los autores de W. Dong, M., 2019.

La separación por HPLC depende predominantemente de algunos parámetros ajustables de la tecnología móvil; fase como polaridad, caudal, pH, composición y algunas propiedades inherentes de la matriz de la muestra entre ellos; tipo y naturaleza de la fase estacionaria; factores ambientales, como temperatura y el tipo de detector (Sahu, P. K., Ramiseti, et. al., 2018).

Una sola condición cromatográfica no puede abordar suficiente información sobre todos los factores que afectan al proceso de separación por HPLC, por lo que es necesario identificar, investigar y controlar cuidadosamente un gran número de variables para superar dificultades (Sahu, P. K., Ramiseti, et. al., 2018).

A forma de interpretación de este método analítico se obtienen los cromatogramas, mismos que se ejemplifican en la figura 4. Los cromatogramas se componen de una gráfica que muestra, por medio de la formación de curvas (o picos) la cantidad de un componente dentro del analito según su afinidad por la fase estacionaria. De dichos picos se puede realizar una separación posterior para poder purificar o analizar cada componente del analito (W. Dong, M., 2019).

Una ventaja del uso de HPLC es que esta es aplicable a una gran variedad de analitos, que es un análisis cuantitativo preciso y es altamente reproducible, por lo que es un

análisis que nos proporciona datos específicos al momento de cuantificar sustancias dentro de un analito específico, con un alto poder de separación con detección sensible (establecido por afinidad). Otra ventaja es que es un análisis que permite el uso de sistemas acoplados, por ejemplo, el de HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC/MS) (W. Dong, M., 2019).

Por otro lado, una desventaja que presenta esta metodología es la falta de un detector universal, por lo que para cada análisis que se busque realizar se debe de acondicionar correctamente todo el sistema y los parámetros según el analito. Del mismo modo, una desventaja a tomar en consideración es que aún se requiere de arduo trabajo para utilizarse como metodología para pruebas regulatorias y de control de calidad (W. Dong, M., 2019).

HPLC como metodología de apoyo para el diagnóstico de *T. spiralis*

En diversos estudios (Cvetkovik, 2016; Lui, Q et al., 2016; Wang, Z et al, 2012; Ren, H. N. et al, 2021; Wang, L et al, 2013) se ha llevado a cabo una separación por HPLC/MS, con una electroforesis confirmatoria posterior, para identificar correctamente las proteínas específicas por la infección por *T. spiralis*.

En el estudio de 2016 de Cvetkocik, para realizar esta metodología, se produjo el anticuerpo monoclonal "mAb 7C2C5", para conseguir el aislamiento de las glicoproteínas que mostraban contener el epítipo correspondiente a los PES de la primera fase de la parasitosis.

Para la realización de este análisis en todos estos estudios revisados (Cvetkovik, 2016; Lui, Q et al., 2016; Wang, Z et al 2012; Ren, H. N. et al, 2021; Wang, L et al, 2013), las condiciones del sistema de HPLC constaron de disolver los péptidos en 40 μ L de ácido fórmico al 0.1%; el analito fue cargado en la columna de fase reversa del kit de Thermo Scientific Acclaim PepMap 100, que consta de columnas de Nano Viper C18, donde las partículas tiene un tamaño de 2 μ m. Previamente, el equilibrio del sistema se llevó a cabo con ácido fórmico al 0.1% usando una columna analítica del kit de Thermo Scientific Easy Column, donde las partículas tienen un

tamaño de 3 μm . Para ello el gradiente fue lineal, con un amortiguador (solución B) de 84% de acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico, con un rango de flujo de 300 nL por minuto, controlado por Tecnología Intelli Flow durante 60 minutos, con un gradiente lineal líquido de la solución B, de 4 a 50% (de 0 a 50 minutos) y de 50 a 100% (de 50 a 54 minutos), la solución B fue mantenida al 100%. El espectrómetro de masas se operó con ion positivo.

El cromatograma que se obtuvo de este análisis mostró cuatro picos, dentro de los cuales, los primeros dos, mostraban un peso molecular aproximado de 320 y 150 kDa, respectivamente. Mientras, los picos 3 y 4, mostraron dos pesos moleculares muy bajos, suponiendo entonces que se trató de fragmentos de algunos péptidos; razón por la cual estos dos picos finales se vieron descartados como de importancia para el estudio (Cvetkovic, 2016).

Tanto el pico 1 como el 2, mostraron cubrir un área muy amplia, sugiriendo de este modo que estos picos representaban un conjunto de proteínas. Por medio de la posterior separación electroforética en gel de ambos picos, fue que se obtuvo la diferenciación de cuatro bandas distintas, correspondientes a proteínas con los pesos moleculares de entre 45 y 66 kDa, 130 kDa, aproximadamente 140 kDa y una dentro de los 300 kDa (Cvetkovic, 2016). Con estos resultados se pudo determinar que estas proteínas constituyen los dos primeros picos dentro del cromatograma.

Finalmente, después de realizar una última separación electroforética bajo condiciones reductoras, se pudieron observar claramente tres bandas; de 45, 49 y 53 kDa. Estas mismas bandas fueron detectadas en la reacción entre los PES de la fase infecciosa 1 con el anticuerpo monoclonal (Cvetkovic, 2016).

Los PES de *T. spiralis*, como se ha descrito anteriormente, no son una solución homogénea y contiene una variedad y cantidad de proteínas ya descritas. Por esta razón es que, al realizar el ensayo de tipo ELISA, en la variedad de antígenos contenidos hay algunos que comparten epítomos con otros helmintos y ello es causa

de que se presenten las reacciones cruzadas, como se mencionó anteriormente.

Por otro lado, la mayor ventaja que se presenta al realizar una HPLC en los PES de *T. spiralis* es que esta metodología puede ser aprovechada para la cuantificación de proteínas y para realizar la purificación de las glicoproteínas de interés, (por medio de un sistema acoplado del tipo (HPLC/MS) y con ellas se podría realizar la estandarización de un ELISA específico para el diagnóstico de la triquinosis (metodología que se puede observar en la figura 5).

Este ELISA constaría del reconocimiento de anticuerpos altamente específicos, contenidos en la muestra, puesto que únicamente se encontrarían ante la presencia de las proteínas específicas de *T. spiralis* (de 44, 49 y 55 kDa). Con un ELISA de esta especificidad se podría diagnosticar exclusivamente la parasitosis ocasionada por *T. spiralis*, sin tener reacciones cruzadas o falsos negativos.

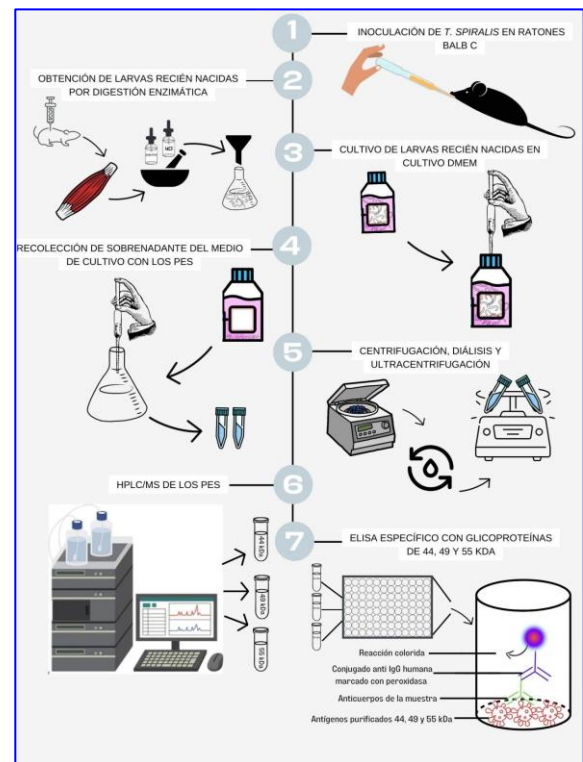


Figura 5. Utilidad de las glicoproteínas específicas de los PES purificadas por HPLC/MS. Diagrama de flujo de la metodología propuesta.

Artículos

Tabla 1. Proteínas exclusivas de *T. spiralis* con potencial antigénico. Se muestran resaltadas en negritas las tres proteínas que caracterizan la infección por *T. spiralis*. (Grzelak, 2020).

Nombre	Peso Molecular (kDa)	Actividad Molecular	Código de Acceso (UniProt)
SML-4	15.81	-	KRY36588.1
Proteína β -1 de choque térmico	18.92	Respuesta ante estrés	XP_003381969.1
Alpha-crystallin B chain	18.94	Unión de iones metálicos	ABJ55914.1
ORF 17.20 hipotético	20.2	-	AAB48489.1
Factor I despolimerizante de actina	22.26	Actividad en unión de actina	KRY43386.1
Subunidad 8 del subcomplejo α de NADH deshidrogenasa	23.11	Transporte de electrones mitocondrial	KRY30644.1
Galectina	33.04	Unión de carbohidratos	KRY32824.1
Antígeno p49	34.54	Actividad de desoxirribonucleasa II	AAA30328.1
Supuesta 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	34.96	Procesos metabólicos de ácidos grasos	KRY30017.1
Proteína 2 similar a SS18	40.05	Actividad coactivadora de transcripción	KRY36096.1
Factor II despolimerizante de actina	40.75	Actividad en unión de actina	KRY43384.1
Actina 5C	42.21	Unión de ATP	XP_003373575.1
Proteína de dominio múltiple similar a la cistatina	46.35	Regulación inflamatoria (Robinson, 2007)	ABH07908.1
2-fosfo-D-glicerato hidro-liasa	48.34	Actividad fosfopiruvato hidratasa	AAK50056.1
Subunidad reguladora 7 del proteosoma 26S	49.95	Actividad ATPasa activadora del proteosoma, actividad peptidasa, unión de ATP	KRY37460.1
Proteína disulfuro isomerasa	57.18	Actividad disulfuro isomerasa	KRY37705.1
Subunidad β de ATP sintasa	59.98	Actividad ATP-Sintasa transportadora de protones	KRY42925.1
Precursor de la subunidad β del proteosoma tipo 6	62.57	-	*UPI0001EFC7F8
Proteína B de filamento intermediario	67.98	Proteína de filamento intermediario	KRY29546.1
Proteína mitocondrial 70 de estrés oxidativo	72.93	Unión de ATP y unión de proteínas mal dobladas	KRY33162.1
Proteína ifa-1 de filamento intermediario	73.45	Proteína de filamento intermediario	KRY27589.1
Proteína homóloga a RFT1	87.05	Endopeptidasa de tipo treonina	KRY36853.1

Artículos

β -MPP	95.37	Actividad metaloendopeptidasa, liberación de N-terminal de los péptidos para transporte de las proteínas en mitocondria	KRY43383.1
Malato deshidrogenasa	107.65	Oxidoreductasa, actúa sobre los grupos donadores de CH-OH, NAD o como aceptor de NADH	KRY38486.1
RNA helicasa	120.68	Unión de ATP, actividad RNA-helicasa, factor de activación de la traducción	KRY33927.1
Proteasa de serina 9 transmembranal	127.86	Actividad endopeptidasa de tipo serina	KRY34986.1
Proteasa de serina	132.94	Actividad endopeptidasa de tipo serina	KRY34983.1
Proteasa de serina 30	135.84	Actividad endopeptidasa de tipo serina	KRY34991.1
Disoxirribonucleasa-2- α	144.48	Actividad de desoxirribonucleasa II	KRY42547.1
Ornitina descarboxilasa	171.65	Actividad histona-lisina N-metiltransferasa, actividad fosfoproteína fosfatasa, unión de iones de zinc	KRY35643.1
Isomerasa peptidil-prolil	186.8	Actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa	KRY27750.1
Miosina-4	229.55	Unión de filamentos de actina, unión de ATP, actividad motora	KRY32036.1

Conclusiones

Debido a la importancia que presenta la parasitosis ocasionada por *T. Spiralis* tanto en el sector salud como en el sector alimentario, por las pérdidas que ésta misma genera, es de vital importancia encontrar métodos de diagnóstico más rápidos y efectivos. Se considera a las técnicas de Inmunoelctrotransferencia y ELISA como métodos de diagnóstico de primera línea, sin embargo, éstos presentan dos tipos de problemáticas; se pueden generar falsos positivos o falsos negativos por la naturaleza de las mismas y son métodos que se consideran confiables únicamente cuando la parasitosis se encuentra en una etapa avanzada posterior a la confirmación de los síntomas en cada paciente.

Sin embargo, se pueden tomar en cuenta una variedad de estudios (Lui, Q et al., 2016; Wang, Z et al 2012; Ren, H. N. et al, 2021; Wang, L et al, 2013), como el estudio realizado por Cvetkovic (2016). En dicho estudio, se pudo observar la identificación y caracterización con alta especificidad por medio de HPLC de las proteínas específicas de la infección por *T. spiralis*. Del mismo modo, se utilizó un anticuerpo monoclonal para poder identificar correctamente estas proteínas.

En el presente artículo no se busca proponer HPLC como método diagnóstico de primera

línea para *T. spiralis*, ya que implica un gran gasto económico por los materiales utilizados. Por lo tanto, se busca establecer las posibilidades de su utilización que permita la purificación u obtención de antígenos específicos a partir de los PES, para posteriormente optimizar el método diagnóstico.

Contar con herramientas para purificación de los antígenos de ES de manera confiable, permite mejorar el desempeño de los métodos de diagnóstico (figura 5), debido a que los métodos tradicionales han mostrado tendencias de ser poco específicos. El poder utilizar la metodología propuesta sugiere promover mayores estudios en los mecanismos que estas proteínas suponen. Del mismo modo, permite realizar ensayos más detallados en modelos animales para evaluar su potencial terapéutico.

Dicho potencial terapéutico se debe a la actividad inmunoprotectora, de tolerancia y modulación que los PES presentan al estar en contacto con el hospedero.

Ya que se ha determinado que tienen mecanismos que favorecen al sistema inmune, así como a su caracterización y purificación. Esto tiene como fin comprender su funcionamiento durante la infección y poder desarrollar nuevos tratamientos y medidas preventivas más específicas para esta parasitosis (COPRAL, 2015).

Conflictos de Interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Financiamiento

La presente investigación no ha recibido ninguna beca específica de agencias de los sectores público, comercial, o sin ánimo de lucro.

Responsabilidades Éticas

Protección de personas y animales: Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación animal responsable y de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Washington, DC. National Academy Press, 1996, del Instituto de Recursos de Animales de Laboratorio, Consejo Nacional de Investigación.

Confidencialidad de los datos: Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Referencias

Abcam (2019). *Anti-Trichinella spiralis* IgG Human ELISA Kit. Disponible en: www.abcam.com.

Ambrosioni, J., Cecchini, D., Castellaro, P., Biscione, F., Lloveras, S., & Orduna, T. (2006). Triquinosis: aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio. Estudio retrospectivo a 10 años (1994-2003) TT - Trichinellosis: epidemiological, clinical and laboratory aspects. A retrospective study (1994-2003). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 24(7), 440-444. <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-048534>

B.C. (2022). *Trichinella spiralis* Nematode Trichuridae Male and Female. 30 Enero 2022, de Chegg Sitio web: <https://www.chegg.com/flashcards/final-lab-practical-68b13ef4-229d-4332-9eb7-93755b9cfe59/deck>

Barruet, R., Devez, A., Dupouy-Camet, J., Karadjian, G., Plavsa, D., Chydériotis, G., Vallée, I., Sofronic-Milosavljevic, L., & Yera, H. (2020). Outbreaks A common source for a trichinellosis outbreak reported in France and Serbia in 2017. *Eurosurveillance*, 25(24), 1-7. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.24.1900527>

Bruschi, F., & Murrell, K. D. (2002). New aspects of human trichinellosis: The impact of new *Trichinella* species. *Postgraduate Medical Journal*, 78(915), 15-22. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.915.15>

Chai, J. Y., Jung, B. K., & Hong, S. J. (2021). Albendazole and Mebendazole as Anti-Parasitic and Anti-Cancer Agents: an Update. *The Korean journal of parasitology*, 59(3), 189-225. <https://doi.org/10.3347/kjp.2021.59.3.189>

Chávez Ruvalcaba, María Isabel, Reveles Hernández, Rosa Gabriela, Saldivar Elías, Sergio J, Muñoz Escobedo, José Jesús, Morales Vallarta, Mario R, Moreno García, María Alejandra. (2006). Evaluación del albendazol, ivermectina y nitazoxanida en infección causada por *Trichinella spiralis* en modelo suino. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 25(2), 78-84. Recuperado en 04 de febrero de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642006000200008&lng=es&tlng=es.

Consejo Mexicano de la Carne. (2022). Compendio Estadístico 2022. Disponible en: www.comecarne.org.

Contreras M del C. Inmunodiagnóstico de la triquinosis humana. *Boletín chileno de parasitología* [Internet]. 2001 Jul; Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-94022001000200003

COPRAL. (2015). Triquinosis. Ministerio de Salud Santiago del Estero. <http://www.msaludsgo.gov.ar/web2/?cargar=articulo&id=1100>

Creative Diagnostics. (2022). *Trichinella spiralis* IgG ELISA, Manual de Usuario. 4882, 1–6.

Cvetkovic J, Sofronic-Milosavljevic L, Ilic N, Gnjatovic M, Nagano I, Gruden-Movsesijan A. Immunomodulatory potential of particular *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components. *Int J Parasitol* [Internet]. 2016;46(13–14):833–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.008>

De la Rosa, J. L. (2000). Zoonosis: Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio (Secretaría de Salud). Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE).

Dimzas, D., Diakou, A., Koutras, C., Gómez Morales, M. A., Psalla, D., Keryttopoulos, P., Deligianni, D., Kontotasios, K., & Pozio, E. (2020). Human trichinellosis caused by *Trichinella britovi* in Greece, and literature review. *Journal of Helminthology*, 94, 1–4. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000075>

Dupouy-Camet, J., Kocieka, W., Bruschi, F., Bolas-Fernandez, F., & Pozio, E. (2002). Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 3(8), 1117–1130. <https://doi.org/10.1517/14656566.3.8.1117>

Food Safety Commission of Japan (2016). Abamectin: Avermectin (Pesticides). *Food safety* (Tokyo, Japan), 4(1), 30–31. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2016004s>

Franssen, F., Johne, A., van der Giessen, J., Nöckler, K., & Mayer-Scholl, A. (2019). Test sensitivity of a commercial serine protease digestion kit for the detection of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* larvae in pig muscle. *Food Microbiology*, 78, 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.012>

Gamble HR, Boireau P, Kockler K, Kapel CMO. (2007). Prevention of *Trichinella*

infection in the domestic pig. In: *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. World Organisation for Animal Health; pp 99-108.

Gamble, H. R., Pozio, E., Bruschi, F., Nöckler, K., Kapel, C. M. O., & Gajadhar, A. A. (2004). International commission on trichinellosis: Recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite*, 11(1), 3–13. <https://doi.org/10.1051/parasite/20041113>
Gamble, H. R., D. Rapic, A. Marinculi & Murrell K.D. (1988) Evaluation of Excretory - Secretory Antigens for the Serodiagnosis of Swine Trichinellosis. *Parasitology A, Diseases P, Faculty V*. 1988;30:131–7.

Gao, H., Tang, B., Bai, X., Wang, L., Wu, X., Shi, H., Wang, X., Liu, X., & Liu, M. (2018). Characterization of an antigenic serine protease in the *Trichinella spiralis* adult. *Experimental Parasitology*, 195, 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.009>

Gondek, M., Bień, J., & Nowakowski, Z. (2018). Use of ELISA and Western blot for serological detection of antibodies to E-S antigens of *Trichinella spiralis* muscle larvae in sera of swine experimentally infected with *Trichinella spiralis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 203, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.07.010>

Gomaa MM. Early diagnosis of experimental *Trichinella spiralis* infection by nano-based enzyme-linked immunosorbent assay (nano-based ELISA). *Exp Parasitol* [Internet]. 2020;212(December 2019):107867. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107867>

Grzelak, S., Stachyra, A., Moskwa, B., & Bień-Kalinowska, J. (2021). Exploiting the potential of 2D DIGE and 2DE immunoblotting for comparative analysis of crude extract of *Trichinella britovi* and *Trichinella spiralis* muscle larvae proteomes. *Veterinary Parasitology*, 289(November). <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109323>

Hamel, D., Bosco, A., Rinaldi, L., Cringoli, G., Kaulfuß, K. H., Kellermann, M., Fischer, J.,

- Wang, H., Kley, K., Mayr, S., Rauh, R., Visser, M., Wiefel, T., Fankhauser, B., & Rehbein, S. (2017). Eprinomectin pour-on (EPRINEX® Pour-on, Merial): efficacy against gastrointestinal and pulmonary nematodes and pharmacokinetics in sheep. *BMC veterinary research*, 13(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1075-7>
- Han, C., Yu, J., Zhang, Z., Zhai, P., Zhang, Y., Meng, S., Yu, Y., Li, X., & Song, M. (2019). Immunomodulatory effects of *Trichinella spiralis* excretory-secretory antigens on macrophages. *Experimental Parasitology*, 196, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.001>
- Hassona, Y., Scully, C., Delgado-Azanero, W., & de Almeida, O. P. (2015). Oral helminthic infestations. In *Journal of investigative and clinical dentistry* (Vol. 6, Issue 2, pp. 99–107). <https://doi.org/10.1111/jicd.12077>
- Hernández-Ancheyta, L., Salinas-Tobón, M. del R., Cifuentes-Goches, J. C., & Hernández-Sánchez, J. (2018). *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory–secretory products induce changes in cytoskeletal and myogenic transcription factors in primary myoblast cultures. *International Journal for Parasitology*, 48(3–4), 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.10.002>
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R., & Maizels, R. M. (2009). Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.008>
- IBL International GmbH. (2020). *Trichinella spiralis* IgG - ELISA - Specific performance characteristics. 49(0). <https://www.novatec-id.com/products/product/trichinella-spiralis-igg.html>
- INSHT. (2013). *Trichinella* Spp. DataBio, 13, 1–4. <http://insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Parasitos/Trichinella spp.pdf>
- Jin, X., Yang, Y., Liu, X., Shi, H., Cai, X., Luo, X., Liu, M., & Bai, X. (2019). Glutathione-S-transferase of *Trichinella spiralis* regulates maturation and function of dendritic cells. 15. <https://doi.org/10.1017/S003118201900115X>
- Koci, W. (2000). Trichinellosis: Human disease, diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology*, 93(3–4), 365–383. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00352-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00352-6)
- Kosanović, M., Cvetković, J., Gruden-Movsesijan, A., Vasilev, S., Milanović, S., Ilić, N., & Sofronić-Milosavljević, L. (2019). *Trichinella spiralis* muscle larvae release extracellular vesicles with immunomodulatory properties. *Parasite Immunology*. <https://doi.org/10.1111/pim.12665>
- Lei, J. J., Hu, Y. Y., Liu, F., Yan, S. W., Liu, R. D., Long, S. R., Jiang, P., Cui, J., & Wang, Z. Q. (2020). Molecular cloning and characterization of a novel peptidase from *Trichinella spiralis* and protective immunity elicited by the peptidase in BALB/c mice. *Veterinary Research*, 51(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00838-1>
- Liu, Q., Huang, S.-Y., Yue, D.-M., Wang, J.-L., Wang, Y., Li, X., & Zhu, X.-Q. (2016). Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products (FhESPs) involved in interacting with host PBMCs and cytokines by shotgun LC-MS/MS. *Parasitology Research*, 116(2), 627–635. doi:10.1007/s00436-016-5327-4
- MayoClinic. (2019). Triquinosis. Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/trichinosis/diagnosis-treatment/drc-20378587>
- Medina Flores, Yolanda. (2017) XXI Taller Internacional de Producción de Anticuerpos Monoclonales contra Agentes Infecciosos y otras Moléculas. (MOLAB). Estado de México, México: Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE). p. 25–42
- Milton, P., Hamley, J., Walker, M., & Basáñez, M. G. (2020). Moxidectin: an oral treatment for human onchocerciasis. Expert review of anti-

infective therapy, 18(11), 1067–1081. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1792772>

Murrell, K. D. (2007). *FAO / WHO / OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. Published by: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) World Health Organization (WHO) World Organization for Animal Health (OIE) ISBN: 92-9044-704-4 & ISBN: 978-92-9044-704-7

OECD. Exámenes de Mercado en México: Estudio de mercado de la carne de cerdo. [Internet]. 2019 Disponible en: <https://www.oecd.org/daf/competition/market-examinations-mexico-pork-meat-market-web-esp.pdf>

Oltean, M., Gavrea, R., Dumitrache, M., Băguț, T., Gherman, C. M., Cozma, V., & Györke, A. (2012). Characterization of host-parasite interactions during the experimental *Trichinella spiralis* infection in pigs. *Helminthologia (Poland)*, 49(3), 139–146. <https://doi.org/10.2478/s11687-012-0029-7>

Pearson, R.D. (2019). Triquinosis. MERCK. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/nematodos-gusanos-redondos/triquinosis>

Peng, R. Y., Ren, H. J., Zhang, C. L., Lv, P., Wei, G. H., & Ming, L. (2018). Comparative proteomics analysis of *Trichinella spiralis* muscle larvae exposed to albendazole sulfoxide stress. *Acta Tropica*, 185, 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.023>

Pereira, A. (2001). Triquinosis. *Parasitología, Ámbito Farmacéutico*. Universidad de Santiago <https://docplayer.es/40350984-Ambito-farmacutico-parasitologia-triquinosis.html>

Pérez-Chabela, M.L, et al. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. *NACAMEH Vol. 9, No. 2*, pp. 77-96,

Qi, X., Yue, X., Han, Y., Jiang, P., Yang, F., Lei, J. J., Liu, R. D., Zhang, X., Wang, Z. Q., & Cui, J. (2018). Characterization of two *Trichinella spiralis* adult-specific DNase II and their capacity to induce protective immunity. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02504>

Ren, H. N., Zhuo, T. X., Bai, S. J., Bai, Y., Sun, X. Y., Dan Liu, R., ... Wang, Z. Q. (2021). Proteomic analysis of hydrolytic proteases in excretory/secretory proteins from *Trichinella spiralis* intestinal infective larvae using zymography combined with shotgun LC-MS/MS approach. *Acta Tropica*, 216, 105825. doi:10.1016/j.actatropica.2021.10

Robinson, M. W., Greig, R., Beattie, K. A., Lamont, D. J., & Connolly, B. (2007). Comparative analysis of the excretory-secretory proteome of the muscle larva of *Trichinella pseudospiralis* and *Trichinella spiralis*. *International Journal for Parasitology*, 37(2), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.08.007>

Saboia-Vahia, L., Borges-Veloso, A., Mesquita-Rodrigues, C., Cuervo, P., Dias-Lopes, G., Britto, C., De Barros Silva, A. P., & De Jesus, J. B. (2013). Trypsin-like serine peptidase profiles in the egg, larval, and pupal stages of *Aedes albopictus*. *Parasites and Vectors*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-50>

Sahu, P. K., Ramiseti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., & Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 590–611. doi:10.1016/j.jpba.2017.05.006

Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. [Internet] 2000 Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/comp/ircsps.html>

SENASICA. (2019). Estudio para determinar el impacto económico de la PPC en México

Diponible en:

https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2021/enero/An%C3%A1lisisSocioecon%C3%B3micoFPC_876a8d25-0d1b-4fa8-94e4-18d59e932257.pdf

Sofronic-Milosavljevic, L., Ilic, N., Pinelli, E., & Gruden-Movsesijan, A. (2015). Secretory products of trichinella spiralis muscle larvae and immunomodulation: Implication for autoimmune diseases, allergies, and malignancies. In *Journal of Immunology Research* (Vol. 2015). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/523875>

Sun, G. G., Lei, J. J., Ren, H. N., Zhang, Y., Guo, K. X., Long, S. R., Liu, R. D., Jiang, P., Wang, Z. Q., & Cui, J. (2019). Intranasal immunization with recombinant *Trichinella spiralis* serine protease elicits protective immunity in BALB/c mice. *Experimental Parasitology*, 201, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.006>

Sun, G. G., Wang, Z. Q., Liu, C. Y., Jiang, P., Liu, R. D., Wen, H., Qi, X., Wang, L., & Cui, J. (2015). Early sero-diagnosis of trichinellosis by ELISA using excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* adult worms. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1094-9>.

The StayWell Company, LLC. Biopsia muscular [Internet]. Carefirst.staywellsolutionsonline.com. 2021 [recuperado el 17 Febrero 2021]. Disponible en: <https://carefirst.staywellsolutionsonline.com/Spanish/Encyclopedia/92,P09174>

Uribarren, T. (2018). TRICHINELOSIS o TRIQUINELOSIS. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trichinelosis.html#>

Wang, H., Cheng, X., Liu, Y., Li, S., Zhang, Y., Wang, X., & Xiang, W. (2020). Improved milbemycin production by engineering two Cytochromes P450 in *Streptomyces bingchengensis*. *Applied microbiology and*

biotechnology, 104(7), 2935–2946. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10410-8>

Wang, L., Wang, Z. Q., Hu, D. D., & Cui, J. (2013). Proteomic Analysis of *Trichinella spiralis* Muscle Larval Excretory-Secretory Proteins Recognized by Early Infection Sera. *BioMed Research International*, 2013, 1–7. doi:10.1155/2013/139745

Wang, Z. Q., Shi, Y. L., Liu, R. D., Jiang, P., Guan, Y. Y., Chen, Y. D., & Cui, J. (2017). New insights on sero-diagnosis of trichinellosis during window period: Early diagnostic antigens from *Trichinella spiralis* intestinal worms. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0252-z>

Wang, Z. Q., Wang, L., & Cui, J. (2012). Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* proteins in intestinal epithelial cells after culture with their larvae by shotgun LC–MS/MS approach. *Journal of Proteomics*, 75(8), 2375–2383. doi:10.1016/j.jprot.2012.02.005

W. Dong, M.. (2019). HPLC and UHPLC for Practicing Scientists. NJ, USA: John Wiley & Sons, 2019.

Yang, Y., Bai, X., Li, C., Tong, M., Zhang, P., Cai, W., Liu, X., & Liu, M. (2019). Molecular characterization of fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *trichinella spiralis* and its potential in inducing immune protection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00122>

Yera, H., Andiva, S., Perret, C., Limonne, D., Boireau, P., & Dupouy-Camet, J. (2003). Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human trichinellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(5), 793–796. <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.5.793-796.2003>