

Estudio serológico de un presunto brote causado por el consumo de carne de puma infectada con *Trichinella patagoniensis* en El Calafate, Santa Cruz (Argentina)

Serological study of a supposed outbreak caused by consumption of cougar meat infected with *Trichinella patagoniensis* in El Calafate, Santa Cruz (Argentina)

Krivokapich Silvio Jesús¹, Arbusti Patricia Andrea¹, Ayesa Graciana Evangelina¹, Gonzalez Prous Cinthia Lorena¹, Gatti Graciana Mabel¹, Saldía Luisa²

RESUMEN: La trichinellosis es una zoonosis parasitaria de alto impacto en la salud pública en Argentina. En Junio de 2008, ocho personas adultas de la localidad de El Calafate, (Provincia de Santa Cruz, Argentina), consumieron carne de puma (*Puma concolor*) infectada con la especie autóctona *Trichinella patagoniensis*. Las muestras de sueros de los pacientes se analizaron mediante ELISA y Western blot, empleando el antígeno de Excreción/Secreción (E/S) de *T. spiralis* y de *T. patagoniensis*. El análisis serológico reveló tres pacientes positivos de los ocho analizados, y un único paciente mostró seroconversión cuando se empleó el antígeno de E/S de *T. spiralis*. Sin embargo, en el análisis por Western blot utilizando el antígeno de E/S de *T. patagoniensis* se detectaron anticuerpos desde la primera muestra en los tres pacientes positivos. Aunque, la serología positiva de los pacientes vinculados al consumo de carne parasitada con *T. patagoniensis* sugiere una infección por esta especie de *Trichinella*, la falta de manifestaciones clínicas de la enfermedad no permite clasificarlo como un brote. Este hallazgo junto al de otros pumas parasitados con *T. patagoniensis*, destinados a consumo humano, revelan el riesgo de infección que representa esta especie autóctona descrita en Argentina, probablemente presente en toda la región Neotropical.

Palabras clave: Patagonia, *Puma concolor*, *Trichinella patagoniensis*, Trichinellosis.

ABSTRACT: Trichinellosis is a parasitic zoonosis with a high impact on public health in Argentina. In June 2008, eight adult patients from the locality El Calafate (Santa Cruz Province, Argentina) consumed cougar (*Puma concolor*) meat infected with the autochthonous species *Trichinella patagoniensis*. Patients' serum samples were analyzed by ELISA and Western blot, using the excretion/secretion (E/S) of *T. spiralis* and *T. patagoniensis*. Serodiagnosis indicated that three of the eight patients were positive; one of them showed seroconversion using E/S antigen of *T. spiralis*. However, antibodies against the E/S antigen of *T. patagoniensis* were detected by Western blot from the first sample in the three positive patients. Although the positive serology of patients involved in the consumption of food infected with *T. patagoniensis* suggest an infection by this *Trichinella* species, the lack of clinical evidence do not allow to classify it as an outbreak. This finding, together with the presence of other cougars infected with *T. patagoniensis*, that were intended for human consumption, reveals the health risk of infection represented by this autochthonous species described in Argentina, probably present throughout the Neotropical Region.

Keywords: Patagonia, *Puma concolor*, *Trichinella patagoniensis*, Trichinellosis.

INTRODUCCIÓN

La trichinellosis es una zoonosis parasitaria producida por el consumo de carne y/o productos derivados de cerdos domésticos y animales silvestres infectados por larvas del género *Trichinella*, presentes en la musculatura. El parásito infecta un amplio rango de hospederos y presenta una extensa distribución geográfica a nivel mundial. En Argentina, la trichinellosis representa un problema con alto impacto en la salud pública. En el período 2007-2017

se notificaron 7.463 casos de trichinellosis humana en el país (Boletín Integrado de Vigilancia, 2007-2017). El género *Trichinella* está compuesto por nueve especies y tres genotipos (Pozio y Zarlenga, 2013). La identificación a nivel de especie de las larvas provenientes de los alimentos implicados en brotes humanos de trichinellosis en Argentina, indica que *Trichinella spiralis* (Owen, 1835) es el principal agente causal de la trichinellosis (Krivokapich et al., 2006, Calcagno et al., 2014, Krivokapich, 2014, Villamil

¹Departamento de Parasitología, INEI, ANLIS, "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, ² Programa para el Control de la Hidatidosis; Hospital Dr. José Formenti, El Calafate, Santa Cruz, Argentina.

et al., 2013, Zotta et al, 2016). No obstante, se han detectado otras especies de este género que circulan en Argentina como *Trichinella pseudospiralis* (Garkavi, 1972) y *Trichinella britovi* (Pozio, La Rosa, Murrell & Lichtenfels, 1992), que habrían sido introducidas luego de la colonización europea, de manera análoga a la de *T. spiralis* (Krivokapich et al, 2015, 2019), mientras *Trichinella patagoniensis* es, en la actualidad, la única especie autóctona de *Trichinella* hallada en la región Neotropical (Krivokapich et al., 2012).

El objetivo del presente estudio es describir un presunto brote de trichinellosis en pacientes que habían ingerido carne de un puma parasitada por *T. patagoniensis* en la localidad de El Calafate (Santa Cruz, Argentina).

MATERIALES Y MÉTODOS

En el Departamento de Parasitología, INEI, ANLIS, "Dr. Carlos G. Malbrán", se procesaron muestras de suero humano, que según la información epidemiológica adjunta provenían de un presunto brote de trichinellosis. El 11 de Junio de 2008, ocho personas adultas, de sexo masculino, consumieron carne de un puma (*Puma concolor*, Lineo 1771) en la localidad de El Calafate (Provincia Santa Cruz, Argentina, 50°20'S, 72°17'O). El alimento se analizó por la técnica de digestión artificial (DA) y se detectó positivo para *Trichinella*, un día después que los implicados consumieran parte de un costillar del animal citado, con una intensidad de infección de 5 larvas por gramo. Las larvas musculares se hallaron viables e infectivas y fueron identificadas a nivel especie como *T. patagoniensis*. Al día siguiente de la DA, los pacientes recibieron asistencia médica y fueron tratados inmediatamente con albendazol 10 mg/Kg/día durante siete días. El incremento de eosinófilos y de enzimas musculares está asociado a las infecciones tempranas por *Trichinella* (Capo y Despommier, 1996). Según la información remitida en la ficha epidemiológica, los análisis de laboratorio provenientes de seis de los implicados, no mostraron valores elevados de creatinfosfoquinasa (CPK) y solo dos evidenciaron eosinofilia (8-11%) (Tabla 1), mientras que ninguno de los ocho pacientes presentó signos o síntomas clínicos de la enfermedad.

Análisis serológico

La infección por *Trichinella* presenta un periodo de ventana inmunológica prolongado, el algoritmo diagnóstico por el sistema de ELISA/Western blot requiere la toma de muestras seriadas para detectar la seroconversión. Las primeras muestras de suero se colectaron de seis pacientes, nueve días después de haber consumido el alimento infectado y cuatro días más tarde se tomaron muestras de suero de los restantes dos. Mientras que las segundas muestras

se obtuvieron únicamente de cuatro pacientes y se recibieron 63 días después de la ingestión de la carne de puma parasitada por *T. patagoniensis* (Tabla 1).

Inicialmente, las muestras se procesaron de acuerdo al algoritmo del serodiagnóstico, mediante el sistema de tamizaje por ELISA y confirmación por Western blot, utilizando el antígeno de E/S de *T. spiralis*. Posteriormente, se analizaron empleando el método de detección por Western blot, con el antígeno de E/S de *T. patagoniensis*, con el fin de evaluar un posible incremento de la sensibilidad del método mediante el uso de un antígeno específico.

Obtención del antígeno

En los ensayos serológicos se utilizó el antígeno E/S de larvas L1. Se obtuvieron dos antígenos de E/S, uno a partir de un aislamiento de *T. spiralis* y el otro de *T. patagoniensis*, registrados en el Centro de Referencia Internacional de *Trichinella* (<https://trichinella.iss.it>) con los códigos ISS643 y ISS2311, respectivamente. Las larvas L1 fueron obtenidas por digestión artificial de tejido muscular de ratones CF-1 (Gamble et al., 2000). Se lavaron tres veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,2 y se cultivaron 18 hs en medio de cultivo DMEM adicionado con 2mM de L-glutamina, 10 mM HEPES y antibióticos (penicilina G 100U/ml, estreptomycin, 100 mg/ml, 1 ml cada 100 ml de solución) a 37 °C con 5% de CO₂ en 1 ml de solución cada 5000 larvas. Se obtuvo el sobrenadante del cultivo y los productos de E/S fueron concentrados por centrifugación (Centriplus YM-10) y conservados a -70 °C. La concentración de proteínas totales fue determinada por medio del método de Bradford (1976).

ELISA

La técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se realizó sobre una placa sólida de polivinilo con pocillos de fondo plano de pegado máximo (Maxisorp). Los pocillos se sensibilizaron con 100 µl de antígeno diluido a una concentración de 50 µg/placa, en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. La placa con el antígeno de *T. spiralis* diluido se incubó durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se lavó tres veces durante 3 minutos con solución PBS-Tween 20 al 0,05% y se incubó 30 minutos a 37 °C con PBS-Tween 20 al 0,05 % / albúmina 3 %. Se realizaron 3 enjuagues con la solución de lavado y la placa quedó en condiciones de uso. Para la prueba, se colocó 100 µl de suero incógnita diluido 1/250 en PBS-Tween 20 al 0,05 % / albúmina 3 % y se incubó 30 minutos a 37 °C. Se lavó tres veces como se indicó anteriormente. Se adicionó en cada pocillo 100 µl de suero de cabra anti IgG humana, conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma Aldrich, A8667) en PBS-Tween 20 al 0,05 %, albúmina 3 %, se incubó 30 minutos a 37 °C.

Se lavó nuevamente tres veces. La reacción de color se desarrolló a temperatura ambiente por agregado de 100 µl/pocillo de 0,04 % de ortofenilendiamina (OPD) y 0,1 % de H₂O₂ en buffer citrato de sodio pH 5. Luego se incubó 5 minutos en oscuridad. La reacción de color se leyó a 450 nm en un lector de ELISA (BIO-TEK- ELx800). Se consideraron no reactivos los sueros que arrojaron una densidad óptica inferior a 0,211 y reactivos a los que exhibieron un valor superior a 0,339, mientras que los valores entre 0,211 y 0,339 se interpretaron como indeterminados.

Western blot

Las proteínas del antígeno E/S de *T. spiralis* y de *T. patagoniensis* fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en una cuba Bio-Rad Mini-Protean III a voltaje constante de 150 V por 1 hora. Luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio rad, 162-0115) a 100V durante una hora. Las membranas se bloquearon toda la noche con PBS-Tween 20/ leche 5% en agitación permanente. Se enjuagaron tres veces durante 10 minutos con solución de lavado. Luego, cada membrana transferida se incubó con el suero incógnita, diluido 1:100, durante una hora con agitación permanente. Se enjuagaron tres veces durante 10 minutos con solución de lavado. Luego se hicieron reaccionar con suero de cabra anti IgG humana conjugado con peroxidasa (Sigma Aldrich A8667), una hora a temperatura ambiente con agitación permanente. Se enjuagaron nuevamente con solución de lavado, tres veces durante 10 minutos. Se revelaron con solución diaminobencidina- H₂O₂ (Sigma D5905-100 TAB) al 0,05%. El Western blot se consideró positivo cuando se observaron bandas de precipitación correspondientes a los antígenos identificados por los pesos moleculares de 45, 49 y 53 kDa.

RESULTADOS

De los ocho pacientes analizados por serología empleando el antígeno E/S de *T. spiralis*, se detectaron tres positivos, reactivos o indeterminados por la técnica de ELISA y confirmados por Western blot (Tabla 1, Fig. 1A). Dos pacientes fueron positivos en la primera y segunda muestras de suero tomadas a los 9 y 63 días, respectivamente, luego de la ingestión de carne de puma infectada con *T. patagoniensis* mientras que el otro paciente mostró seroconversión, ya que fue negativo en la primera y positivo en la segunda muestra. El estudio de los sueros de estos tres pacientes mediante Western blot empleando el antígeno E/S de *T. patagoniensis* arrojó un resultado similar, a excepción del paciente que evidenció seroconversión con el E/S de *T. spiralis* que fue positivo tanto en la primera como en la segunda muestra (Fig. 1B).

Las muestras de suero de los restantes cinco pacientes fueron reactivas, no reactivas o indeterminadas por ELISA y todas resultaron negativas por Western blot. Éstas incluyen a los casos de los pacientes 4 y 5, que presentaron eosinófilos elevados (Tabla 1, Fig. 1).

DISCUSIÓN

El estudio serológico de las personas que ingirieron carne de puma infectado con *T. patagoniensis*, en la localidad de El Calafate, reveló tres pacientes positivos de los ocho analizados. En el serodiagnóstico con antígeno E/S de *T. spiralis*, el paciente 3 mostró seroconversión, ya que la primera muestra de suero tomada nueve días luego del consumo de la carne de puma, fue negativa y la segunda muestra, tomada 63 días después, evidenció la presencia de anticuerpos anti-*Trichinella*, mientras que los pacientes 1 y 2 fueron positivos desde el inicio del análisis. Los anticuerpos

Tabla 1. Resultados del análisis de laboratorio y el estudio serológico mediante el sistema ELISA empleando el antígeno de E/S de *T. spiralis*

Paciente	CPK ¹ (UI/L)	Eosinófilos ² (%)	Serología 9 dpc ³		Serología 13 dpc ³		Serología 63 dpc ³	
			DO ⁴	ELISA	DO ⁴	ELISA	DO ⁴	ELISA
1	116	0	0,808	Reactivo	-	-	0,922	Reactivo
2	107	4	0,685	Reactivo	-	-	0,824	Reactivo
3	180	4	0,299	Indeterminado	-	-	0,730	Reactivo
4	117	8	0,031	No Reactivo	-	-	0,075	No Reactivo
5	75	11	0,086	No Reactivo	-	-	-	-
6	43	4	0,245	Indeterminado	-	-	-	-
7	-	-	-	-	0,067	No Reactivo	-	-
8	-	-	-	-	0,472	Reactivo	-	-

Valores de referencia: ¹CPK, Creatinfosfoquinasa, 26-195UI/L; ²Eosinófilos: 2-4%. ³dpc: días post consumo de la carne parasitada con *T. patagoniensis*. ⁴DO: densidad óptica.

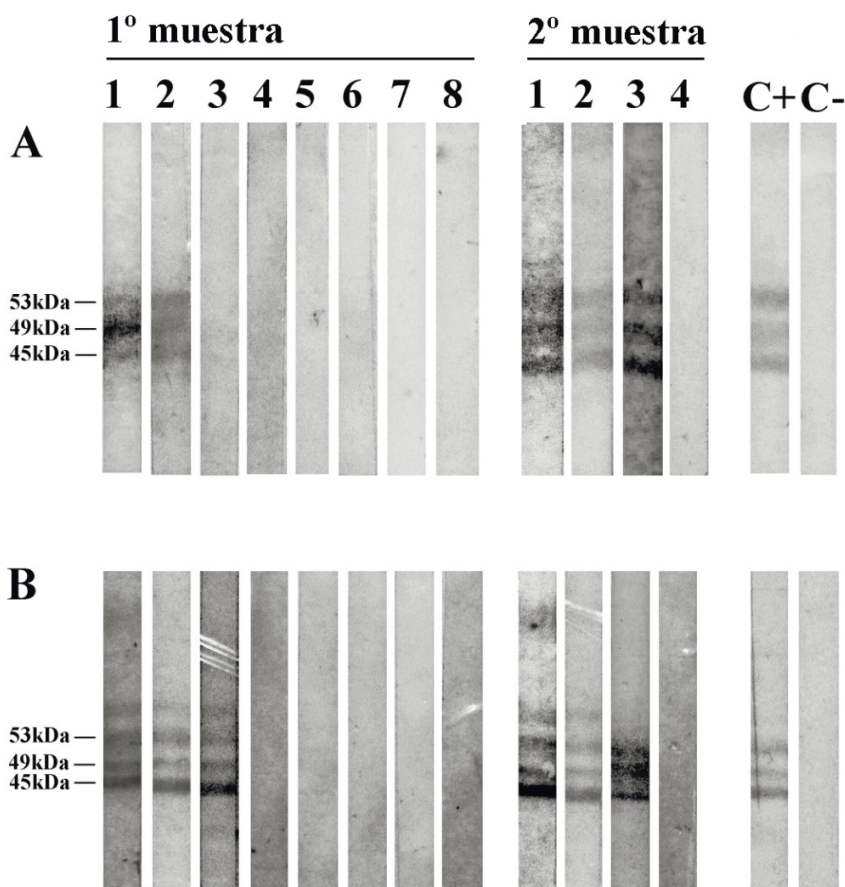


Figura 1. Análisis mediante Western blot con antígenos de excreción/secreción de *T. spiralis* (A) y de *T. patagoniensis* (B) de los sueros de los pacientes infectados (1 a 8). Izquierda: pesos moleculares de las bandas antigénicas específicas de una infección por *Trichinella*. Derecha: C- Suero de persona de área no endémica de trichinellosis. C+ Pool de sueros de pacientes con trichinellosis confirmada.

detectados en la primera muestra de suero pueden corresponder a una infección previa por *Trichinella*, ya que las IgG específicas suelen persistir por años, en tanto que la seroconversión señala una infección aguda del parásito, dado que en humanos los anticuerpos se evidencian entre la segunda y quinta semana después de la infección (Yang *et al.*, 2016). Sin embargo, el análisis por Western blot utilizando el antígeno de E/S de *T. patagoniensis* detectó anticuerpos desde la primera muestra, en los tres pacientes positivos. La detección serológica por ambos tipos de antígenos está en concordancia con la reactividad cruzada observada con productos de E/S de distintas especies de *Trichinella* (Yang *et al.*, 2016). La mayor sensibilidad de detección del E/S de *T. patagoniensis* frente al E/S de *T. spiralis* podría asociarse a la utilización de un antígeno de la misma especie del parásito que causó la infección. Sin embargo, los ensayos serológicos no son recomendados para la identificación a nivel especie en *Trichinella* (Gamble *et al.*, 2004).

En las infecciones humanas por *Trichinella* es habitual la detección de eosinofilia y el incremento de las enzimas musculares, como la CPK, entre la segunda y quinta semana luego de la infección (Capo y Despommier, 1996; Gottstein *et al.*, 2009). La información epidemiológica adjunta a las muestras de sueros que se enviaron no revela valores alterados de

elevados únicamente en los pacientes 4 y 5, que resultaron negativos a la serología. No obstante, estos análisis se realizaron en muestras de sangre extraídas a solo nueve días del consumo del alimento infectado. Ninguno de los implicados manifestó signos ni síntomas característicos de la enfermedad. La ausencia de evidencia clínica de trichinellosis podría deberse a que los pacientes recibieron el tratamiento temprano con albendazol, durante la fase inicial de infección con *T. patagoniensis*. Este antihelmíntico es altamente efectivo contra los parásitos adultos durante la etapa intestinal de la infección, y previene que se establezcan las larvas L1 en el músculo del hospedero (Siriya-satien *et al.*, 2003). Los resultados de serología positiva de los tres pacientes vinculados al consumo de carne parasitada con larvas viables e infectivas de *T. patagoniensis* sugieren una infección por esta especie, pero la falta de manifestaciones clínicas no permiten confirmar un brote por este genotipo autóctono.

En Argentina, el hallazgo de pumas parasitados con *T. patagoniensis*, provenientes de las provincias de Río Negro y Catamarca (Krivokapich *et al.*, 2008, 2012), revelan el riesgo de infección por el consumo de animales silvestres que representa la presencia de esta especie autóctona, y probablemente con ocurrencia en toda la región Neotropical. Adicionalmente, en Argentina, también se han reportado infecciones

humanas por consumo de carne de puma y jabalí infectados con *T. spiralis* (Krivokapich, 2014, Villamil et al., 2013). Esto indica, que más allá de la especie de *Trichinella* implicada, se debe enfatizar en el riesgo zoonótico que constituye el consumo de animales de caza.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a Raúl Lasala por facilitarnos información clínica sobre los pacientes y a Marcela Monfellano por su asistencia técnica.

LITERATURA CITADA

- Boletín Integrado de Vigilancia, 2007-2017. Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, República Argentina www.msal.gov.ar/index.php/home/boletin-integrado-de-vigilancia. Último acceso 07 agosto 2018.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Calcagno MA, Bourlot I, Taus R, Saracino MP, Venturiello SM. 2014. Description of an outbreak of human trichinellosis in an area of Argentina historically regarded as *Trichinella*-free: the importance of surveillance studies. *Veterinary Parasitology* 200: 251-256.
- Capó V, Despommier D. 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 9: 47-54.
- Gamble HR, Bessonov AS, Cuperlovic K, Gajadhar AA, van Knapen F, Noeckler K, Schenone H, Zhu X. 2000. International commission on trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Veterinary Parasitology* 93: 393-408.
- Gamble HR, Pozio E, Bruschi F, Nöckler K, Kapel CMO, Gajadhar AA. 2004. International commission on trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite* 11: 3-13.
- Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. 2009. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 127-145.
- Krivokapich SJ, Molina V, Bergagna HFJ, Guarnera EA. 2006. Epidemiological survey of *Trichinella* infection in domestic, synanthropic and sylvatic animals from Argentina. *Journal of Helminthology* 80: 267-269.
- Krivokapich SJ, González Prous CL, Gatti GM, Confalonieri V, Molina V, Matarasso H, Guarnera E. 2008. Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. *Veterinary Parasitology* 156: 234-240.
- Krivokapich SJ, Pozio E, Gatti GM, González Prous CL, Ribicich M, Marucci G, La Rosa G, Confalonieri V. 2012. *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *International Journal for Parasitology* 42: 903-910.
- Krivokapich S. 2014. Identificación, distribución geográfica y transmisión de *Trichinella*. En: Basualdo Farjat J, Enría D, Martino P, Rosenzvit M, Seijo A. (Eds.). Temas de Zoonosis VI, Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina: 459-465.
- Krivokapich S, González Prous CL, Gatti GM, Saldía L. 2015. First finding of *Trichinella pseudospiralis* in the Neotropical region. *Veterinary Parasitology* 208: 268-271.
- Krivokapich S, Gatti GM, González Prous CL, Degese MF, Arbusti PA, Ayesa GE, Bello GV, Salomón MC. 2019. Detection of *Trichinella britovi* in pork sausage suspected to be implicated in a human outbreak in Mendoza, Argentina. *Parasitology International* 71: 53-55.
- Pozio E, Zarlenga DS. 2013. New pieces of the *Trichinella* puzzle. *International Journal for Parasitology* 43: 983-997.
- Siriyasatien P, Yingyoud P, Nuchprayoon S. 2003. Efficacy of albendazole against early and late stage of *Trichinella spiralis* infection in mice. *Journal of the Medical Association of Thailand* 86: S257-262.
- Villamil J, Krivokapich S, Ribicich M. 2013. Análisis epidemiológico de trichinellosis en humanos y jabalíes del Departamento de Utracán, La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes* 8: 16-19.
- Yang Y, Cai YN, Tong MW, Sun N, Xuan YH, Kang YJ, Vallée I, Boireau P, Cheng SP, Liu MY. 2016. Serological tools for detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *One Health* 2: 25-30.
- Zotta CM, Silva A, Pili N, Colino C, Bienaimé S, Peñalver PA, López Miranda L, Hollmann P, Ayesa G, Krivokapich S, Arbusti A, Buonarrotti A, Lavayén S, Gatti G, González Prous C, Bolpe J. 2016. Brote de trichinellosis en Mar del Plata - 2014. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes* 11: 15-24.

Recibido: 12 de agosto de 2018

Aceptado: 28 de enero de 2019
