

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TRICHINELLA SPIRALIS EN SUERO DE PORCINOS

MOLECULAR DIAGNOSIS OF TRICHINELLA SPIRALIS IN PIG SERA

Mariana Inés Recavarren (Fares Taie Instituto de Análisis),
Silvina Quintana (Fares Taie Instituto de Análisis), Exequiel Scialfa (Fares Taie Instituto de Análisis), Ivana Viera (Fares Taie Instituto de Análisis), Vanesa Di Gerónimo (Fares Taie Instituto de Análisis) y Silvio Krivokapich (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”) - Argentina

Resumen

El objetivo de este proyecto fue generar una herramienta preventiva de diagnóstico, sensible y específica, basada en técnicas de avanzada en biología molecular para la triquinelosis, una de las enfermedades zoonóticas más importantes de nuestro país, con el fin de evitar el consumo de carnes infectadas con el parásito y proponer un programa epidemiológico de erradicación en piaras. Para ello, fueron inoculados con larvas de *T. spiralis* cerdos recién destetados, y se extrajeron muestras de sangre durante 31 días para su posterior diagnóstico por biología molecular y ELISA.

Palabras clave: Diagnóstico, PCR en tiempo real, *Trichinella spiralis*, cerdos.

Abstract

The objective of this project was generated a sensitive and specific preventive diagnostic tool for one of the most important zoonotic diseases in our country, trichinellosis, based on advanced techniques in molecular biology, aiming at avoid consumption of *Trichinella spiralis* in infected meat, and proposing a future epidemiological eradication program in herds. Weaned pigs were inoculated with larvae of *T. spiralis*, and blood samples were taken for 31 days for further diagnostic molecular biology and ELISA.

Keywords: Diagnosis, Real Time PCR, *Trichinella spiralis*, pigs.

Introducción

El presente trabajo fue desarrollado en el marco del proyecto galardonado con el 3.º puesto en Sanidad Animal para grupos de investigación en formación de los Premios Senasa 2013-2014 a la Investigación, Transferencia y Comunicación de la Sanidad, la Calidad y la Inocuidad Agroalimentarias.

La triquinelosis es una zoonosis emergente en varias regiones del mundo y se la considera un grave problema para la salud pública. En la Argentina, hubo 5.217 casos notificados en humanos, en el período 1990-1999 (Bolpe y Boffi, 2001), y 5.820, entre 2000 y 2010 (Ministerio de Salud de la Nación, 2000-2010). Esta parasitosis se presenta como una enfermedad de alta endemicidad, y es causada por el nematodo *Trichinella* que se transmite al humano principalmente por la ingestión de carne de cerdo infectada (carne mal cocida, chacinados y salazones). En nuestro país, prácticamente el 70 % de las provincias registraron brotes humanos (Guarnera *et al.*, 2006).

El método recomendado por la Comisión Internacional de Triquinelosis para el diagnóstico de la infección en alimentos es la técnica de digestión artificial, que implica la digestión *in vitro* del tejido muscular con ácido clorhídrico y pepsina, seguida de la visualización microscópica y la cuantificación de las larvas del parásito. No obstante, esta técnica tiene una baja sensibilidad, ya que generalmente se analizan muestras compuestas o pools de 100 g de tejido en mataderos o de 10 g en muestras individuales en laboratorios, y no siempre el material remitido es el recomendado para cerdos domésticos (diafragma y masetero). Además se realiza *post mortem*, con lo cual no es posible el diagnóstico preventivo que permita realizar un control epidemiológico en las piaras.

La técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), basada en la detección de inmunoglobulina G (IgG) contra antígenos del parásito, es la prueba serológica comúnmente utilizada en el diagnóstico de la infección

por *Trichinella* en muestras de sueros de cerdos vivos (Uparanukraw *et al.*, 1997). Aunque es un método indirecto y solo proporciona evidencia de la exposición a *Trichinella*, los ensayos de ELISA permiten una mejora en la sensibilidad de la prueba en comparación con la técnica de digestión artificial; sin embargo, existen desventajas debido a la pérdida de la especificidad por la reacción cruzada del antígeno con otras infecciones parasitarias del huésped (Nöckler *et al.*, 2009).

Las técnicas basadas en la amplificación de ADN mediante PCR (Polymerase Chain Reaction-Reacción en cadena de la polimerasa), como el método de PCR multiplex y la RFLP, son capaces de detectar y diferenciar en el nivel de especie las muestras parasitadas por *Trichinella* (Soule *et al.*, 1993; Zarlenga *et al.*, 1999 y 2001; Wu *et al.*, 1999). No obstante, las metodologías basadas en PCR convencional presentan baja sensibilidad y no son cuantitativas (Espy *et al.*, 2006).

Métodos moleculares de detección como PCR en tiempo real ofrecen una alta sensibilidad y especificidad, ya que permiten la detección del ADN del parásito en un escaso volumen de muestra. La técnica de PCR en tiempo real es una amplificación selectiva de una región específica dentro de un ADN blanco que es cuantificado con marcadores fluorescentes durante la reacción. Posibilita la detección cualitativa y la medición cuantitativa del ADN del parásito (Jauregui *et al.*, 2001; Learmount *et al.*, 2009). Así, se detecta el patógeno responsable de la infección con una alta especificidad y sensibilidad, rápidamente (dos horas) y en gran escala. Se han descrito varios ensayos de PCR en tiempo real, dirigidos a diferentes genes para la detección específica del ADN de *T. spiralis* pero aplicados al estudio de muestras de vida silvestre (Cuttel *et al.*, 2012; Atterby *et al.*, 2009) o para el estudio de modelos experimentales (Li *et al.*, 2010; Golab *et al.*, 2009). Guenther *et al.* desarrollaron una metodología de PCR en tiempo real para detección de ADN de *T. spiralis*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis* en cerdos domésticos infectados que mostró una sensibilidad de 0,1 LPG (Guenther *et al.*, 2008), pero no hay antecedentes sobre detección de *T. spiralis* por PCR en tiempo real realizado en muestras de suero de porcinos derivadas al laboratorio de diagnóstico.

Objetivo general

El objetivo general del trabajo fue generar una herramienta de diagnóstico molecular sensible y específica a partir de muestras de suero porcino, para una de las enfermedades zoonóticas más importantes de nuestro país, la triquinosis, con el fin de evitar el consumo de carnes infectadas con este parásito y proponer un programa epidemiológico de erradicación en piaras.

Metodología

Ensayo experimental: se realizó un desafío experimental de inoculación de 12 lechones destetados (28-30 días de edad) con larvas recién nacidas de *T. spiralis*. Posteriormente, se tomaron muestras de sangre mediante punción de la vena del pabellón auricular (día por medio durante 31 días). Los animales fueron separados en 4 grupos de 3 individuos:

- Grupo 1: controles sin tratar (con carga larvaria 0, T0).
- Grupo 2: animales inoculados con cargas bajas (100 larvas por gramo L/G; T100).
- Grupo 3: inoculados con cargas medias (1000 L/G; T1000 L/G).
- Grupo 4: inoculados con cargas altas (5000 L/G; T5000 L/G).

A los 31 días postinoculación se realizó el sacrificio de los lechones para el posterior análisis de las muestras de suero por biología molecular y ELISA, y de los diafragmas por digestión artificial.

Digestión artificial: 10 a 20 gramos de músculo diafragmático de los lechones sacrificados fueron pesados y triturados en una procesadora. Se preparó el líquido de digestión en un erlenmeyer de 500 ml con la proporción muestra / líquido de digestión = 1 / 15; para 10 gr de muestra se utilizó 150 ml de líquido de digestión (1,5 gramos de pepsina, 1,5 ml de ácido clorhídrico y 150 ml de agua a 44 °C a 46 °C). Una vez preparado el líquido, se incorporó la muestra de carne picada y una barra magnética, se cubrió con papel de aluminio para evitar la pérdida de temperatura y se

realizó la digestión constante a una temperatura de 44 °C y 46 °C. La carne fresca se digirió durante 30 minutos. Concluida la digestión, se filtró el líquido a través de un tamiz colocado en el embudo de separación de *squibb* y se dejó sedimentar durante 30 minutos. Se extrajeron 50 ml del líquido de digestión mediante la apertura del robinete inferior, se colocaron en una probeta graduada y se dejó sedimentar 30 minutos. Se aspiraron 40 ml del líquido sobrenadante y se dejó un volumen de 10 ml (sedimento) que fue depositado en una placa de Petri para realizar la lectura en lupa y conteo de larvas.

ELISA: los anticuerpos IgG anti-*Trichinella sp.* fueron detectados mediante el sistema en serie ELISA - Western blot utilizando como antígeno el producto excretor secretor de L1 de *T. spiralis* (aislamiento de referencia ISS643). La técnica se realizó sobre una placa sólida de polivinilo con pocillos de fondo plano de pegado máximo (Maxisorp) sensibilizados con 100 µl de antígeno diluidos a una concentración de 50 µg/placa, en buffer carbonato-bicarbonato pH 9,6. La placa con el antígeno diluido se incubó a 4 °C over night, se lavó tres veces durante tres minutos con solución de lavado (PBS-Tween 20 al 0,05 %) y se incubó 30 minutos a 37 °C con PBS/Tween 20 al 0,05 % / albúmina 3 %. Se repitieron los tres enjuagues con la solución de lavado, 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. Luego se lavó y adicionó en cada pocillo 100 µl de suero de conejo anti-ratón IgG total, marcado con peroxidasa (Sigma A-5670) diluido 1/3000 en PBS/Tween 20 al 0,05 % / albúmina 3 % y 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 40 orthophenylendiamina (OPD) y 0,04 % de H₂O₂ en buffer citrato de sodio. Luego, se incubó cinco minutos en oscuridad. La reacción de color se leyó a 450 nm en un lector de ELISA (BIO-TEK Instruments).

Biología molecular: una vez obtenidas las muestras de suero, se evaluaron diferentes metodologías para la extracción de ADN. Se corroboró el éxito de las extracciones mediante cuantificación del ADN y amplificación por PCR en tiempo real de los controles internos correspondientes. Se llevó a cabo la cuantificación de ADN presente en las muestras

extraídas mediante el kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Invitrogen), utilizando el termociclador en tiempo real Rotor Gene 6000.

Controles internos de amplificación: con el fin de chequear el éxito de la extracción de ADN y la inexistencia de inhibición en las reacciones de PCR, se realizó una amplificación mediante PCR en tiempo real con cebadores (CERH y CER L) que detectaron ADN porcino. Se consideraron aceptables para el estudio de la presencia de *T. spiralis* por PCR en tiempo real aquellas muestras con valores de Ct (Ciclo umbral o Cycle Threshold) del control interno <35. Las amplificaciones de un fragmento de 133 pb de ADN porcino se llevaron a cabo en un Termociclador Rotor Gene 6000, en un volumen final de 20 µl, utilizando Eva-Green como intercalante fluorescente. El programa de ciclado para la detección consistió en una desnaturalización inicial de tres minutos a 95 °C; 35 ciclos de 94 °C por 20 s; 51 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. Una vez finalizada la amplificación se efectuó una curva de disociación, siendo la T_m (Temperatura de melting) del producto amplificado de 80,5 ± 1 °C. La amplificación fue aceptada, ya que el control positivo y las muestras analizadas presentaron un producto de PCR del peso molecular esperado (T_m: 80,5 ± 1 °C) y no lo presentaron ni el control negativo de ADN ni el control sin templado.

Reacciones de PCR en tiempo real para la detección de ADN de *T. spiralis*: en aquellas muestras aptas, se llevaron a cabo amplificaciones de un fragmento de 133 pb de ADN de *T. spiralis* (cebadores de diseño propio) en un termociclador Rotor Gene 6000, en un volumen final de 20 µl, utilizando Eva-Green como intercalante fluorescente. El programa de ciclado rápido para la detección consistió en una desnaturalización inicial de dos minutos a 95 °C; 45 ciclos de 94 °C por 10 s; 50 °C por 10 s y 72 °C por 15 s. Una vez finalizada la amplificación, se efectuó una curva de disociación, siendo la T_m del producto amplificado de 73,5 ± 1 °C. La amplificación fue aceptada, ya que el control positivo (ADN purificado de *T. spiralis*) y las muestras analizadas presentaron un producto de PCR del peso molecular esperado (T_m: 73,5 ± 1 °C) y no lo presentaron ni el control negativo de ADN ni el control sin templado.

Las metodologías elegidas pueden ser utilizadas a largo plazo, dado que las validaciones fueron hechas bajo estrictas normas de calidad (ISO 9001, 14001 y 17025, SENASA y OPDS) para asegurar su precisión, sensibilidad y especificidad. Además, pueden ser replicadas en otros laboratorios de diagnóstico que cuenten con el equipamiento de biología molecular necesario.

Resultados

Digestión artificial: de los diafragmas analizados, en uno solo no se pudo realizar la digestión artificial porque el animal murió antes de culminado el experimento. De los tres animales inoculados con las menores cargas larvarias 100 L/G (T100), se observaron *post mortem*

10 y 6 L/G. De los tres animales inoculados con cargas larvarias de 1000 L/G (T1000) se observó una carga larvaria *post mortem* de 120 y 192 L/G, y de los dos animales inoculados con las cargas larvarias más altas 5000 LPG (T5000), se observaron cargas larvarias *post mortem* de 1456 y 472 L/G (Tabla 1).

ELISA: el día 28 (p.i.) se detectaron anticuerpos en dos animales muestreados (7 y 10), inoculados con 1000 y 5000 larvas, respectivamente. En las muestras correspondientes al día 31 p.i. se detectaron anticuerpos en todos los animales inoculados, excepto en dos inoculados con bajas cargas (100 larvas).

Biología molecular: en los diafragmas de los animales sacrificados correspondientes a los T100, T1000 y T5000, se encontró ADN de *T. spiralis*. No se encontró ADN de *T. spiralis* en las muestras de suero analizadas.

Tabla resumen de resultados

Animal	Sexo	Carga larvaria inicio inoculación (lpg)	Carga larvaria final diafragma	Pcr tiempo real diafragma	Elisa suero	Pcr tiempo real suero
12	MACHO	0	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	NEGATIVO
2	HEMBRA	0	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	NEGATIVO
3	HEMBRA	0	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	NEGATIVO
4	HEMBRA	100	18	POSITIVO	0,039	NEGATIVO
5	MACHO	100	6	POSITIVO	0,439	NEGATIVO
6	HEMBRA	100	6	POSITIVO	0,049	NEGATIVO
7	HEMBRA	1000	120	POSITIVO	0,475	NEGATIVO
8	HEMBRA	1000	192	POSITIVO	0,471	NEGATIVO
9	MACHO	1000	196	POSITIVO	0,222	NEGATIVO
10	HEMBRA	5000	1456	POSITIVO	0,593	NEGATIVO
11	HEMBRA	5000	Murió	sin muestra	sin muestra	sin muestra
1	MACHO	5000	472	positivo	0,7	NEGATIVO

ELISA No Reactivo < 0.117; Indeterminado > = 0.117 y < = 0.390; Reactivo > 0.390. NR: No realizado.

Discusión

Luego de 31 días postinoculación, se detectaron anticuerpos en todos los animales inoculados, excepto en dos de bajas cargas (100 larvas). Cerdos con cargas larvarias musculares elevadas pueden ser detectados como reactivos al estudio serológico entre el día 17 y 21 p.i., pero, en infecciones bajas, los anticuerpos pueden no ser detectados mediante ELISA porque las muestras posiblemente no abarcaron el período de seroconversión necesario para detectar anticuerpos (Gottstein *et al.*, 2009). El día 28 (p.i.) se detectaron anticuerpos en dos animales muestreados (7 y 10), inoculados con 1000 y 5000 larvas, respectivamente. Krivokapich (2012) encontró que

ratones inoculados con 500 larvas musculares E/S de *T. spiralis* incrementaron los anticuerpos recién a partir del día 30 pi, lo cual indica un período de silencio inmunológico. Los ensayos experimentales con cerdos domésticos, jabalíes, zorros y caballos revelaron que la seroconversión es dependiente de la dosis infectiva y la carga larvaria en músculo de *T. spiralis* (Krivokapich, 2012). Evidentemente, la técnica de ELISA sigue siendo una herramienta útil de diagnóstico para saber si el animal tiene una infección por *T. spiralis* a partir de los 28 días de contagio.

Previamente, en nuestro laboratorio, se desarrolló una técnica de PCR en tiempo real utilizando control interno y cebadores o “primers” de diseño propio para la detección sensible y específica de ADN de *T. spiralis* en 21 muestras de músculo de cerdos, la cual fue contrastada con la técnica de digestión enzimática (Quintana *et al.*, paper en evaluación). De las 21 muestras analizadas, 5 negativas por la técnica de digestión enzimática fueron positivas por PCR en tiempo real, lo cual demuestra que la técnica utilizada presenta una mayor sensibilidad que la prueba gold standard. En el ensayo de inoculación de lechones se encontró ADN de *T. spiralis* en los diafragmas de los animales correspondientes a los T100, T1000 y T5000, pero no se encontró ADN en las muestras de suero analizadas. Podemos suponer entonces que la utilización de la técnica podría tener sus limitaciones cuando el volumen del suero es escaso. Además, poco se sabe de la fisiología del intercambio entre suero y linfa de dicho parásito que subestimaría esta técnica de diagnóstico molecular.

Conclusiones

Del análisis de los resultados de este ensayo experimental de inoculación con *T. spiralis* en lechones, podemos decir que la técnica de biología molecular para detectar el ADN del parásito a partir de muestras de suero no sería de utilidad para control epidemiológico.

Este trabajo se realizó en forma conjunta entre dos instituciones públicas nacionales y provinciales (ANLIS Malbrán, Buenos Aires, y la División de Zoonosis

Rurales de la Dirección de Atención Primaria de la Salud, de la Provincia de Buenos Aires) y una privada (Fares Taie Instituto de Análisis, Mar del Plata). La prioridad fue desarrollar un método de diagnóstico novedoso, rápido, sensible y específico para una de las zoonosis más importantes que afectan a nuestro país, utilizando los recursos tecnológicos y humanos disponibles en pos del crecimiento de la salud. De esta manera, y trabajando en un equipo interdisciplinario, pudimos alcanzar este objetivo que aspira a continuar la tarea de análisis de muestras de pacientes afectados en brotes.

Bibliografía

- Bien, J. (2007), “The usefulness of ELISA test for early serological detection of *Trichinella spp.* infection in pigs”, *Wiadomouci parazytologiczne*, vol. 53, n.º 2, pp. 149-151.
- Bolpe, J.; Scialfa, E.; Gallicchio, O. Ledezma, M. Benitez, M. y P. Aguirre (2013), “Triquinosis en la provincia de Buenos Aires: alimentos involucrados en brotes de la enfermedad”, *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes*, vol. 8, n.º 1, pp. 9-13.
- Cuttell, L.; Corley, S. W.; Gray, C. P.; Vanderlinde, P. B.; Jackson, L. A. y R. J. Traub (2012), “Real-time PCR as a surveillance tool for the detection of *Trichinella* infection in muscle samples from wildlife”, *Veterinary Parasitology*, vol. 188, n.º 3-4, pp. 285-93.
- Erali, M.; Voelkerding, K. V. y C. T. Wittwer (2008), “High resolution melting applications for clinical laboratory medicine”, *Exp Mol Pathol*, 85 (1), pp. 50-58. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.03.012.
- Espy, M.; Uhl, J.; Sloan, L.; Buckwalter, S.; Jones, M. y E. Vetter (2006), “Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing”, *Clinical Microbiology Rev.*, N.º 19, pp. 165-256.

- Golab, E.; Rozej, W.; Wnukowska, N.; Rabczenko, D. y A. Masny (2009), "Detection of *Trichinella spiralis* DNA in mouse faeces during the early stage of infection", *J Microbiol Methods*, 78 (2), pp. 213-215. doi: 10.1016/j.mimet.2009.05.019.
- Guenther, S.; Nöckler, K.; von Nickisch-Rosenegk, M.; Landgraf, M., Ewers, C.; Wieler, L. H. y P. Schierack (2008), "Detection of *Trichinella spiralis*, *T. britovi* and *T. pseudospiralis* in muscle tissue with real-time PCR", *J Microbiol Methods*, 75 (2), pp. 287-292.
- Gutiérrez, G. (2007), "Análisis de la variabilidad genética en cepas de *Trichinella spiralis* obtenidas de caballos de dos regiones geográficas de México", tesis de maestría en Biología Experimental, México, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa [en línea]. Disponible en: <148.206.53.84/tesiuami/UAMI14162.pdf>.
- Han, C.; Lu, Y.; Li, X.; Shi, Y. y M. Song (2011), "Temporal quantification of Ts43 gene expression of *Trichinella spiralis* using real-time RT-qPCR", *J Microbiol Methods*, 84 (1), pp. 8-11. doi: 10.1016/j.mimet.2010.09.019.
- Istituto Superiore di Sanità Viale Regina Elena [s. f.], "Identification of *Trichinella* Muscle Stage Larvae at the species level by Multiplex PCR. European Union Reference Laboratory for Parasites Department of Infectious, Parasitic and Immunomediated Diseases Unit of Gastroenteric and Tissue Parasitic Diseases [en línea]. Disponible en: <http://www.iss.it/binary/cr1p/cont/PCR%20method%20WEB%20SITE.1177083731.pdf>.
- Krivokapich, S. J.; Molina, V.; Bergagna, H. F. y E. Guarnera (2006), "Epidemiological survey of *Trichinella* infection in domestic, synanthropic and sylvatic animals from Argentina", *Journal of Helminthology* vol. 80, pp. 267-269.
- Krivokapich, S. J.; Prous, C. L.; Gatti, G. M.; Confalonieri, V.; Molina, V.; Matarasso, H. y E. Guarnera (2008), "Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina", *Veterinary Parasitology*, vol. 156, n.º 3-4, pp. 234-240.
- Krivokapich, S. J.; Pozio, E.; Gatti, G. M.; Prous, C. L.; Ribicich, M.; Marucci, G., La Rosa, G. y V. Confalonieri (2012), "*Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America", *International Journal of Parasitology*, vol. 42, n.º 10, pp. 903-910.
- Krivokapich, S. J. (2012), "Evaluación de marcadores moleculares de la infección temprana por *Trichinella* mediante PCR en tiempo real", tesis de maestría en Microbiología Molecular UNSAM-ANLIS "Dr. Carlos g. Malbrán", Argentina [en línea] disponible en: <koha.unsam.edu.ar>.
- Li, F.; Wang, Z. Q. y J. Cui (2007), "Early detection by polymerase chain reaction of migratory *Trichinella spiralis* larvae in blood of experimentally infected mice", *Wiad Parazytol*, 53 (2), pp. 149-151.
- Manual de procedimientos para la técnica de digestión artificial en frigoríficos y mataderos de cerdos (2010) [en línea]. Disponible en: <http://www.maa.gba.gov.ar/2010/SubPED/Ganaderia/archivos/manual_digestion_artifical.pdf>.
- Ministerio de Salud de la Nación (2010), *Boletín de Vigilancia, Dirección de Epidemiología*, Período 2000-2010, Buenos Aires.
- Nöckler, K.; Hamidi, A.; Fries, R.; Heidrich, J.; Beck, R. y A. Marinculic (2004), "Influence of methods for *Trichinella* detection in pigs from endemic and non-endemic European region", *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, vol. 51, n.º 6, pp. 297-301.

- Nöckler, K.; Reckinger, S.; Broglia, A.; Mayer-Scholl, A. y P. Bahn [s. f.], "Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-Trichinella-IgG in pig sera", *Veterinary Parasitology*, vol. 163, n.º 4, pp. 341-347.
- Reed, G. H.; Kent, J. O. y C.T. Wittwer (2007), "High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics", *Pharmacogenomics*, vol. 8, n.º 6, pp. 597-608.
- Ribicich, M.; Gamble, H. R.; Bolpe, J.; Scialfa, E.; Krivokapich, S.; Cardillo, N.; Betti, A.; Holzmann, M. L.; Pasqualetti, M.; Fariña, F. y A. Rosa (2010), "Trichinella infection in wild animals from endemic regions of Argentina", *Parasitological Research*, vol. 107, n.º 2, pp. 377-380.
- Vossen, R. H.; Aten, E.; Roos, A. y J. T. den Dunnen (2009), "High-Resolution Melting Analysis (HRMA): more than just sequence variant screening", *Human Mutation*, vol. 30, n.º 6, pp. 860-866.
- Wittwer, C. T. (2009), "High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations", *Human Mutation*, vol. 30, n.º 6, pp. 857-859.
- Wu, Z.; Nagano, I.; Pozio, E. e Y. Takahashi (1999), "Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of Trichinella isolates", *Parasitology*, vol. 118, n.º 2, pp. 211-218.
- Zarlenga, D. S.; Chute, M.B.; Martin, A. y C. M. Kapel (1999), "A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non encapsulated genotypes of *Trichinella*", *International Journal of Parasitology*, vol. 29, n.º 11, pp. 1859- 1867.
- Zarlenga, D. S.; Chute, M. B.; Martin, A, y C. M. Kapel (2001), "A single, multiplex PCR for differentiating all species of *Trichinella*", *Parasite*, vol. 8, n.º 2, pp. S24-S26.