

Frecuencia de *Trichinella spiralis* en sangre y músculo de equinos sacrificados en dos diferentes mataderos, uno de tipo industrial y otro de tipo rural en el Estado de México, México

Frequency of *Trichinella spiralis* in blood and muscles of horses from two slaughter houses (industrial and rural) in the State of Mexico, Mexico

Enedina Jiménez-Cardoso* María de Lourdes Caballero-García* Gabriel Uribe-Gutiérrez*
Esmeralda Trejo-Hernández* Francisco Ramón Gay-Jiménez**

Abstract

The objective of this study was the evaluation of the frequency of *Trichinella spiralis* in horse meat that is used for human and animal consumption. A total of 150 horses were sampled, from two private slaughterhouses, one industrial slaughterhouse with some level of technology and the other one rural with less technology. Seventy animals from the first one and 80 from the second one were sampled. After the horses were slaughtered 10 g were taken from three muscles of each horse: gluteus, masseter and diaphragm or tongue as well as 5 ml of blood. The muscle tissue was observed looking for *Trichinella spiralis* larvae by: a) trichinoscopy b) artificial digestion and c) polymerase chain reaction. This last technique was used also for the blood analysis. For both slaughterhouses, all muscles observed by trichinoscopy were negative. By artificial digestion analysis, *T. spiralis* larvae were found in the three muscles of only one horse of the 70 that came from the industrial slaughterhouse, which represents a 1.42% prevalence in this lot. Of the eighty horses of the rural slaughterhouse *T. spiralis* was found in only the masseter of one horse and this represents 1.25% positiveness. With the polymerase chain reaction *T. spiralis* was identified in three muscles of one horse of the industrial slaughterhouse and in blood of another two horses which gives a total infection frequency of 4.28%. In the horses from the rural slaughterhouse, the polymerase chain reaction was positive in muscles of three horses; the total frequency of infection in this lot was 3.75%, taking into consideration that the results for blood with this technique came out negative. It is concluded that the frequency of *T. spiralis* was similar to what has been found in other reports, although there were differences between both slaughterhouses in relation to the parasitic burden of the animals.

Key words: TRICHINELLOSIS, HORSES, PCR, TRICHINELLA SPIRALIS, INDUSTRIAL SLAUGHTERHOUSE, RURAL SLAUGHTERHOUSE .

Resumen

El objetivo de este estudio fue evaluar la frecuencia de *Trichinella spiralis* en carne de caballo que se utiliza para consumo humano y para animales. Se muestrearon 150 caballos procedentes de dos mataderos particulares, uno semitecnificado industrial y otro rural, 70 pertenecieron al primero y 80 al segundo; después de sacrificar a los animales, de cada caballo se tomaron 10 g de tres músculos; glúteo, masetero, diafragma o lengua, así como 5 ml de sangre; en la carne se buscó presencia de larvas de *T. spiralis* mediante: a) triquinoscopia, b) digestión artificial y c) reacción de la cadena de la polimerasa, esta última también fue utilizada en la sangre. Los resultados mostraron que la triquinoscopia fue negativa en todos los músculos evaluados de los dos mataderos. Por digestión artificial, en un caballo del matadero semitecnificado industrial se encontraron larvas de *T. spiralis* en los tres músculos con 1.42% de infección y en el músculo (masetero) de un caballo del matadero rural, por lo que la positividad de este último fue de 1.25%. La reacción en cadena de la polimerasa fue positiva en

Recibido el 30 de junio de 2004 y aceptado el 8 de diciembre de 2004.

*Hospital Infantil de México "Federico Gómez", Laboratorio de Investigación en Parasitología, Dr. Márquez 162, Col. Doctores, 06720, México, D. F., Telefax: (55)5588-4019, Correo Electrónico: enedina@servidor.unam.mx

**Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, Calzada del Hueso s/n, 11000, Col. Villa Quietud, México, D. F., Correo Electrónico: gayjfr@hotmail.com

los tres músculos de los caballos del matadero industrial y en la sangre de dos animales que resultaron positivos, dando una frecuencia total de infección de 4.8%. En el matadero rural la reacción en cadena de la polimerasa fue positiva en músculos de tres caballos, mientras que los análisis de sangre fueron negativos en todos los caballos evaluados indicando una frecuencia total de la infección de 3.75%. Se concluye que la frecuencia de *T. spiralis* fue alta y semejante entre los dos mataderos pero hubo diferencias en relación a su carga parasitaria.

Palabras clave: TRIQUINELOSIS, TRICHINELLA SPIRALIS, CABALLOS, PCR, MATADERO INDUSTRIAL (MI); MATADERO RURAL (MR).

Introduction

Trichinellosis is a zoonotic disease with a worldwide distribution caused by different species of the *Trichinella* genus. In Mexico, real prevalence is unknown, but there are epidemiological reports of outbreaks in various Mexican states (Zacatecas, Mexico, Durango, Sonora, Chihuahua, Jalisco, Michoacan and Mexico City).¹

Between 1972 and 1973, the importance of human *trichinellosis*, was demonstrated in a study of biopsies from 1000 human cadavers, that reported a 4.2% frequency of *T spiralis*.² In general, the principal host of the disease is the pig, and between 1991 and 1995, there were 282 cases reported. However, the pig is not the only animal that is a host of *trichinellosis*. The importance of the consumption of infected horse meat was underlined by the outbreaks of *trichinellosis* in 1993, 1994 and 1998 in France due to the consumption of infected horse meat imported from Canada, Mexico and Yugoslavia.³

Although, in Mexico, horse meat is directed towards consumption by domestic animals, it has been found that there is an increase of consumption by humans due to its low price in the market.

Unfortunately, in the last 15 years, the lack of sanitary control has increased the amount of human outbreaks of *trichinellosis* due to the consumption of horse meat infected with larvae of *Trichinella spiralis*,^{4,5} even though the diagnosis of infection in horse meat includes the use of trichinoscopy and artificial digestion methods in the slaughterhouses of federal inspection type (TIF) that comply with international sanitary principles and export the horse meat to Europe and Asia.⁶ In other slaughterhouses, that are not TIF establishments and horses are being sacrificed for human consumption, sanitary inspection has greater limitations due to the lack of analytic infrastructure for the diagnosis of the parasite.

Taking the above into consideration, the purpose of this investigation, was to determine the frequency of *T. spiralis* in horses that arrive at two slaughterhouses that have different sanitary conditions and are in different socioeconomic status areas: one industrial slaughterhouse (IS) in the central valley of Mexico

Introducción

La triquinosis constituye una enfermedad zoonótica de amplia distribución mundial, es causada por diferentes especies del género *Trichinella*. En México la prevalencia no se conoce con exactitud, pero se tienen antecedentes de brotes epidemiológicos en diferentes entidades de la República; entre éstas, Zacatecas, Estado de México, Durango, Sonora, Chihuahua, Jalisco, Michoacán y ciudad de México.¹

Uno de los informes donde se demuestra la importancia de la triquinosis humana es el estudio realizado entre 1972-1973 en mil biopsias de cadáveres,² donde la frecuencia de triquinosis fue de 4.2%. Se ha señalado que el principal transmisor de la enfermedad es el cerdo. Entre 1991 y 1995 se notificaron 282 casos. Sin embargo, este animal no es el único transmisor. La exportación de caballos de Canadá, México y Yugoslavia³ puso en evidencia la importancia del consumo de carne de caballo infectado, al originarse brotes en Francia en 1993, 1994 y 1998.

Aunque en México la carne de caballo se destina principalmente como alimento para los animales domésticos, su bajo costo da como resultado que se incrementa el consumo por el humano.

La falta de control sanitario ha permitido que en los últimos 15 años se presenten brotes de triquinosis humana por el consumo de carne de caballo infectada con larvas de *Trichinella spiralis*,^{4,5} a pesar de que la detección del parásito en la carne de caballo se hace por medio de dos procedimientos, triquinoscopia y digestión artificial, en los mataderos, tipo inspección federal (TIF), que funcionan bajo principios sanitarios internacionales y exportan carne de caballo a Europa y Asia.⁶ En algunos mataderos que no son establecimientos TIF se sacrifican caballos para consumo humano, donde la inspección sanitaria tiene aún mayores limitaciones por no disponer de infraestructura analítica para el diagnóstico del parásito.

En este contexto, el propósito de este trabajo fue determinar la frecuencia de *T. spiralis* en dos mataderos de caballos con diferentes condiciones

and the second one from a rural site in Sierra Nevada (RS), both in the State of Mexico, Mexico, and that are regulated by the Health Institute of the State of Mexico (ISEM). In the Children's Hospital of Mexico, three laboratory analyses methods were used for the identification of the parasite: *a*) trichinoscopy, *b*) artificial digestion and *c*) PCR amplification of the pPRA fragment of *T. spiralis* in the blood and the masseter, gluteus and diaphragm or tongue muscles of horses.

Materials and methods

Taking into consideration the slaughter volume of every two months in the slaughterhouses, the sample size was established with the following formula:

$$n = n_0/1 + (n_0/N)$$

where: $n_0 = Z^2pq/d^2$

p = proportion of the characteristics = 0.05

q = difference without the characteristic = 0.95

z = degree of precision (distribution curve of $z = 1.96$)

d^2 = degree of sampling precision where $d=0.05$

Seventy horses were analyzed from an industrial slaughterhouse (IS) and 80 from a rural slaughterhouse (RS); both sexes were taken into account in the included variables. Most of the horses had their origin in the southeast of the Mexican Republic and showed no symptomatology for this parasite. Horses are slaughtered at the end of their productive life, since they are generally used as pack or work animals. Animals that show foot fractures are also sent to slaughter.

The samples that were collected from each horse were five ml of blood, as well as 10 gm of each muscle tissue from the masseter, gluteus and diaphragm or tongue. All muscle samples were analyzed by trichinoscopy and artificial digestion for the presence of larvae of the genus *Trichinella*.⁷

Amplification of the pPRA gene was done by PCR in muscles and blood of the horses, following the amplification conditions for this gene.

The DNA extraction from blood was performed by the phenol- chloroform- isoamlic alcohol method.⁸ One hundred μ l of blood were resuspended in 300 μ l of lysis buffer (0.15 M NaCl; 0.1M EDTA; 0.5% SDS; 0.1 mg/ml of proteinase K). It was incubated for two hours at 37°C and later two extractions were carried out with phenol-chloroform-isoamlic alcohol (25:24:1). The nucleic acids were precipitated with an absolute ethanol volume and 0.1 ml of total volume 3M pH 8.0 sodium acetate.

socioeconómicas y sanitarias; uno de tipo industrial en el valle de México (MI) y otro de tipo de rural en Sierra Nevada (MR), ambos se encuentran en el Estado de México, México, y son regulados por el Instituto de Salud del Estado de México (ISEM). El análisis de laboratorio se hizo empleando tres métodos en el Hospital Infantil de México para identificar al parásito: *a*) triquinoscopia, *b*) digestión artificial y *c*) amplificación por PCR del gen pPRA de *T. spiralis* en músculos de los caballos, masetero, glúteos, diafragma o lengua y sangre.

Material y métodos

De acuerdo con el volumen de matanza por bimestre en los mataderos, se calculó el número de animales del tamaño de la muestra que debían muestrearse, utilizando la fórmula:

$$n = n_0/1 + (n_0/N)$$

donde: $n_0 = Z^2pq/d^2$

p = proporción de la característica = 0.05

q = diferencia sin la característica = 0.95

z = grado de exactitud (este valor está determinado por la curva de distribución de $z = 1.96$)

d^2 = grado de precisión en el muestreo (donde $d = 0.05$)

Del matadero semitecnificado industrial (MI) se analizaron 70 caballos y del matadero rural (MR) 80 animales, en las variables incluyentes se consideraron animales de sexo distinto. La mayor parte de los caballos eran originarios de la región del sureste de la República mexicana y no presentaron ninguna semiótica relacionada con esta parasitosis; regularmente los caballos son sacrificados al final de su vida productiva al ser animales de carga o de desecho, también se envían a la matanza equinos que presentan fractura de patas, entre otras patologías.

De cada caballo se tomaron 5 ml de sangre y 10 g de los músculos masetero, glúteo, diafragma o lengua. En todos los músculos se utilizó la técnica de triquinoscopia y digestión artificial para la búsqueda de larvas del género *Trichinella*.⁷

Por PCR se buscó la amplificación del gen pPRA en los músculos y en la sangre de los caballos, siguiendo las condiciones de amplificación para este gen.

La extracción del ADN de la sangre se realizó por método fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.⁸ Se resuspendieron 100 μ l de sangre en 300 μ l de amortiguador de lisis (0.15 M NaCl l; 0.1M, EDTA; 0.5% SDS; 0.1 mg/ml de proteinasa K). Se incubó durante 2 h a 37°C y se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Los

After one hour at -20°C , the DNA was precipitated and it was recuperated by centrifuging 8 000 *g* during 30 min. RNA was eliminated after incubation with 20 mg/ml of RNA_{ase} at 37°C . A new extraction of DNA was performed with organic solvents according to the procedure previously mentioned. The DNA pellet was resuspended in TE buffer (10 mM of Tris-HCl, 1 mM of EDTA).

PCR of the pPRA gene

The 25 μl reaction mix contained 2.5 μl of buffer solution (10 mM Tris HCl; 50 mM KCl); 1.5 mM of MgCl₂; 0.2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTA); 1M of (+) 5'CTTGTAAGCGGTGGTGCCTA3' (-) 5'CATAGAGGAGGCAACATTACCT3'; 500 μg of DNA from blood and 0.3 μl of Taq polymerase (5U/ μl).^{*} The program used for amplification was: a cycle at 94°C for 3 minutes; and 30 cycles at 93°C for 1 minute; 55°C for one minute and 72°C for 3 minutes plus an extension cycle of 72°C for 8 minutes. The amplification DNA fragments were separated in a 1 % agarose gel with a run buffer of TAE 1X (0.04 M tris-acetate; 100 mM EDTA) with 5 μl of ethidium bromide (1 mg/ml). The gel was run by electrophoresis at 80 volts for 45 minutes and results were analyzed through UV light. The result was positive with bands of 600 and 800 pb or 1 200 pb.

ácidos nucleicos fueron precipitados con un volumen de etanol absoluto y 0.1 ml del volumen total con acetato de sodio 3M pH 8.0.

El ADN fue precipitado después de una hora a -20°C y se recuperó al centrifugar a 8 000 *g* durante 30 min. El ARN fue eliminado después de incubarlo con 20 mg/ml de RNA_{asa} a 37°C . Una nueva extracción del ADN fue realizada con solventes orgánicos mediante el procedimiento antes mencionado. La pastilla de ADN fue resuspendida en amortiguador TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA).

PCR del gen pPRA

La mezcla de reacción de 25 μl contenía 2.5 μl de solución amortiguadora (10.0 mM Tris-HCl; 50 mM KCl); 1.5 mM de MgCl₂; 0.2 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTA); 1 M de (+) 5'CTTGTAAGCGGTGGTGCCTA3'(-) 5'CATAGAGGAGGCAACATTACC T3'; 500 μg de ADN obtenido de la sangre y 0.3 μl de Taq polimerasa (5U/ μl).^{*} El programa de amplificación fue: Un ciclo a 94°C de 3 min; y 30 ciclos (93°C de 1 min; 55°C de 1 min y 72°C de 3 min) más un ciclo extensión de 72°C de 8 min. Los fragmentos amplificados de ADN fueron separados en un gel de agarosa al 1% usando como amortiguador de corrimiento TAE 1X (0.04M tris-acetato; 100 mM EDTA) adicionado de 5 μl de bromuro de etidio (1 mg/ml). El gel se corrió a 80 volts durante 45 minutos. Posteriormente dio como positivo cuando se

^{*}Perkin Elmer.

Cuadro 1

FRECUENCIA DE *Trichinella spiralis* EN DOS MATADEROS DE CABALLOS EN EL ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO, EVALUADOS POR DIGESTIÓN ARTIFICIAL
FREQUENCY OF *Trichinella spiralis* IN TWO HORSE SLAUGHTERHOUSES IN THE STATE OF MEXICO, MEXICO, EVALUATED BY ARTIFICIAL DIGESTION

| Specimen | Artificial digestion | | | | | |
|------------------------|----------------------|----|------|--------------|----|------|
| | IS n = 70 | | | RS n = 80 | | |
| | + | - | % | + | - | % |
| Masseter | 1 | 69 | 1.42 | 1 | 79 | 1.25 |
| Gluteus | 1 | 69 | 1.42 | 0 | 80 | 0 |
| Diaphragm or tongue | 1 | 69 | 1.42 | 0 | 80 | 0 |
| Total affected animals | 1 | | | 1 | | |

G, gluteus; M, masseter; L, tongue; B, blood, n = sample size; (+) positive; (-) negative; IS, industrial slaughterhouse with technology; RS, rural slaughterhouse; F, frequency in (%).

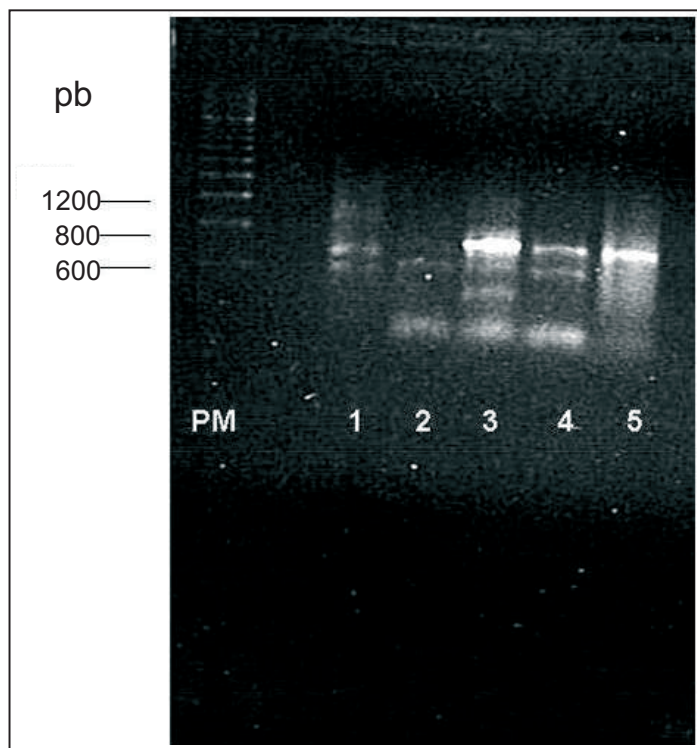


Figura 1. Análisis por electroforesis de los productos de PCR para detectar *T. spiralis* en tres músculos del caballo 30, matadero industrial (MI); carril 1, glúteo; carril 2, masetero; carril 3, diafragma; carril 4, sangre del caballo número 48; carril 5, sangre del caballo número 51.

Figure 1. Electrophoretic analysis of the PCR products in order to detect *T. spiralis* in three muscles of horse number 30, from the industrial slaughterhouse (IS); lane 1, gluteus; lane 2, masseter; lane 3, diaphragm; lane 4, horse blood from horse number 48; lane 5, horse blood from horse number 51.

Cuadro 2

FRECUENCIA DE *Trichinella spiralis* EN LOS MÚSCULOS Y SANGRE DE CABALLOS SACRIFICADOS EN DOS DIFERENTES MATADEROS EN EL ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO, EVALUADOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

FREQUENCY OF *Trichinella spiralis* IN BLOOD AND MUSCLES OF SLAUGHTERED HORSES IN TWO DIFFERENT SLAUGHTERHOUSES IN THE STATE OF MEXICO, MEXICO, EVALUATED BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION

| Number of the horse | IS (F-4.26%) n = 70 | | | | RS (F-3.75%) n = 80 | | | | |
|------------------------|------------------------|---|---|-------|------------------------|---|---|---|-------|
| | G | M | D | Blood | the horse | G | M | T | Blood |
| 30 | + | + | + | - | 35 | + | + | + | - |
| 48 | - | - | - | + | 58 | - | + | - | - |
| 56 | - | - | - | + | 60 | + | - | + | - |

G, gluteus; M, masseter; D, Diaphragm; T, tongue; B, blood, n = sample size; (+) positive; (-) negative; IS, industrial slaughterhouse with technology; RS, rural slaughterhouse; F, frequency in (%).

Results

All muscle samples were negative by trichinoscopy in both slaughterhouses. In the industrial slaughterhouse (IS), by artificial digestion three muscles of horse number 30 came out positive (gluteus, masseter and diaphragm) where more than six larvae per muscle sample were observed. This gave an infection frequency of 1.42 %. In the rural slaughterhouse (RS) the artificial digestion was positive in the masseter

visualizaron mediante UV bandas de 600 y 800 pb o 1 200 pb.

Resultados

Todos los análisis realizados por triquinoscopia fueron negativos en los dos mataderos, pero con digestión artificial en el matadero industrial (MI) los tres músculos del caballo número 30 resultaron positivos (glúteo, masetero y diagrama) donde se observaron

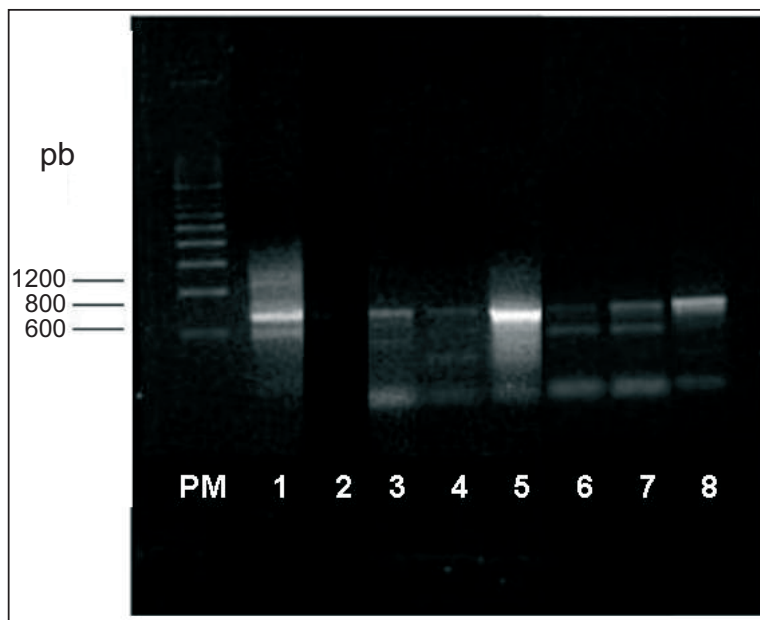


Figura 2. Análisis por electroforésis de los productos de PCR para detectar *T. spiralis* en tres músculos del matadero rural (MR), PM; carril 1, testigo positivo; carril 2, testigo negativo; carril 3, caballo 60, glúteo; carril 4, caballo 60, lengua; carril 5, caballo 58, masetero, carril 6, caballo 35, glúteo; carril 7, caballo 35, lengua; carril 8, caballo 35, masetero.

Figure 2. Electrophoretic analysis of the PCR products in order to detect *T. spiralis* in three muscles of the rural slaughterhouse (RS), PM; lane 1, positive control; lane 2, negative control; lane 3, horse 60, gluteus; lane 4, horse 60, tongue; lane 5, horse 58, masseter, lane 6, horse 35, gluteus; lane 7, horse 35, tongue; lane 8, horse 35, masseter.

muscle of one horse; this came out to be 1.25 % infectivity (Table 1).

Positive results to the parasite's DNA were found by PCR in the three muscles samples of horse number 30 that came from the industrial slaughterhouse and in two blood samples of horses numbers 48 and 51 (Figure 1) with an infection of 4.28 % (Table 2).

In the rural slaughterhouse (RS) the samples that were analyzed by PCR were positive in muscles of three horses. Horse number 35 came out positive in three muscles (masseter, gluteus and tongue), horse number 58 in masseter and horse number 60 came out positive in two muscles (gluteus and tongue). The resulting three positive horses from a total of 80 studied animals in this slaughterhouse corresponded to 3.75 % (Figure 2).

Discussion

In Mexico, information about horse meat consumption is scarce; nevertheless, it is known that it is used to produce different kinds of sausages, ham and meat for hamburgers.⁹ In this context, consumption of this kind of meat has always been done by the lowest income groups, that don't have access to other meats; this last idea suggests that consumption of this product has increased in the last few years due to its lower cost.

Although, the manner in which the horses get infected is not absolutely clear, especially since these animals are herbivorous, there are some theories of how horses can get *trichinellosis*: *a*) by the ingestion of insects, that could be accidental hosts of these parasites; *b*) by grazing in grasslands contaminated with pork feces or small wild animals infected by

más de seis larvas por músculo con una frecuencia de infección de 1.42%. Igualmente en el matadero rural (MR) la digestión artificial fue positiva en el músculo masetero, con 1.25% de infectividad (Cuadro 1).

Los resultado de PCR realizados en el caballo 30 (MI) fueron positivos en los tres músculos además en la sangre de dos animales; en los caballos 48 y 51 se detectó la presencia del ADN del parásito (Figura 1), por lo que la infección correspondió a 4.28% (Cuadro 2).

En relación con el matadero rural (MR), las muestras analizadas por PCR en los músculos de tres caballos resultaron positivos. El caballo 35 resultó positivo en los tres músculos (masetero, glúteo, lengua); el caballo 58 en el músculo masetero, y el caballo 60 en dos músculos (glúteo y lengua). La positividad se halló en tres caballos de un total de 80 estudiados, esto correspondió a 3.75% (Figura 2).

Discusión

En México la información que se tiene sobre el consumo de carne de caballo es muy escasa; sin embargo, se sabe que se utiliza para la elaboración de diferentes embutidos, como chorizo, longaniza, jamón y carne para hamburguesas.⁹ En este contexto el consumo de este tipo de carne siempre ha sido para la población pobre y que no puede acceder a otras carnes; esto último sugiere que dicho consumo se ha incrementado en los últimos años debido a su bajo costo.

A pesar de que el mecanismo por el cual los caballos adquieren la infección aún no está del todo claro, más aún cuando estos animales son herbívoros, se han propuesto algunas teorías de las diferentes vías

having eaten infected meat one or two days before; *c*) by eating grass contaminated by rodents; and, *d*) by feeding them somehow with contaminated pork or wild carnivores infected with different species of *Trichinella*. Nevertheless, the way that horses can be infected is not yet clear.¹⁰

The epidemiological chain, in this case, does not coincide with the known biological cycle of this parasite. Every year, thousands of horses are sacrificed in slaughterhouses to provide the marketplace with this type of meat. Consumption is done by the population in general but also by pets and zoo animals. Perhaps this is the way the permanence of the parasite in certain regions is promoted.

Taking into consideration the information that we have, there are no diagnostic tests for this parasite in the living animals therefore, sanitary control is difficult. In relation to the results that were obtained, the trichinostomy test turned out to be an inefficient technique, since larvae were not detected in any of the horses of both slaughterhouses. The sensitivity of this test is three larvae per gram of tissue; another possibility could be that the animals didn't have a detectable parasitic load. This suggests that samples should include more than 10 g of tissue for observations.

A probable explanation is that *T. spiralis* larva could have been in another place other than where the sample was taken; that is to say, we must study further what is the specific cellular tropism of this parasite,¹¹ since the larvae may have preference for certain zones of the muscles in horses, which permit the natural infection or maybe the parasite is limited to certain locations in the muscle, as is mentioned in another study.¹²

In any case, the results suggest that if only this method is used to diagnose *trichinellosis* in horses, the results may not be too reliable. Nevertheless, it must be remembered that this procedure is the least expensive and the simplest one that can be used in slaughterhouses especially the rural type ones.

In relation to the second procedure, artificial digestion permitted larva of the genus *Trichinella* to be found in muscles of two horses, one from each slaughterhouse. This indicates that this method has greater possibilities of rendering a reliable diagnosis. This method might not be the most appropriate one when there are low parasitic loads or early infections, so that is the reason why the search must be done in more than two muscles.

It is important that we underline that there were differences between the horses of the two enterprises. In the IS, larvae were found on three muscles of a horse, with more than five larvae on each muscle; this means that the horse was highly infected; while the

en que los caballos pueden adquirir la triquinosis: *a*) por la ingestión de insectos, que pueden ser huéspedes paraténicos, *b*) por pastorear en praderas contaminadas con heces de cerdos y animales salvajes que previamente han ingerido carne infectada de 1-2 días, *c*) por alimentarse con pasturas contaminadas con residuos de roedores y *d*) por la ingestión de carne de cerdos y carnívoros silvestres infectados con especies del género *Trichinella*. Sin embargo, la manera en que los caballos se infectan aún no está clara.¹⁰

Anualmente miles de caballos son sacrificados en los mataderos para abastecer un mercado con este tipo de carne; de esta demanda participa la población, pero también se utiliza en la elaboración de alimentos para animales de compañía y de zoológicos; quizá de aquí se propicie la permanencia de la cadena epidemiológica.

Hasta donde se ha podido obtener información, no se realiza ninguna prueba presuntiva de diagnóstico para esta parasitosis, esta actividad dificulta un control sanitario. De acuerdo con algunos resultados la triquinostomía no resultó una técnica eficiente, ya que no se pudieron observar larvas en ninguno de los caballos de los dos mataderos, se considera que la sensibilidad de esta técnica es tres larvas por gramo de tejido, una posibilidad es que los animales no presentaron una carga parasitaria notablemente mayor, ello sugiere que se utilizaron más de 10 g de tejido para hacer la observación.

Una explicación probable es que las larvas de *T. spiralis* pudieron haber estado en otra parte del tejido que se analizó; es decir, este parásito presenta un tropismo celular,¹¹ ya que estas larvas tienen predilección por algunas zonas musculares en caballos, lo cual permite la infección naturalmente o tal vez el parásito se localice de una forma delimitada en el músculo, como se menciona en otro estudio.¹²

De cualquier forma, los resultados sugieren que este método no fue el más sensible y si se utiliza sólo para el diagnóstico de la triquinosis en los equinos, los resultados no serán del todo confiables. Sin embargo, no hay que olvidar que este procedimiento es el más sencillo y económico, así como factible para utilizarse en los establecimientos de sacrificio, sobre todo en los rurales.

En relación con el segundo procedimiento, la digestión artificial permitió encontrar larvas musculares del género *Trichinella* en dos caballos, uno de cada matadero, lo cual indica que utilizando este método existe mayor posibilidad de tener un diagnóstico más confiable.

Es importante señalar que se presentaron diferencias entre los caballos de las dos empresas, en el de MI se encontraron larvas en los tres músculos del

horse in the rural slaughterhouse (RS) had only one larva detected in one muscle, but not in the other muscles.

The existence of this parasitosis in animals destined to slaughter depends on the origin of the horse, without taking into consideration the sanitary conditions of slaughter in both types of establishments. Thus, with the information that was obtained, the endemic region in Mexico where the horses infected with *trichinellosis* came from was identified. The results of this study suggest that these infected animals came from the Mexican southeast or Veracruz.^{13,14}

On the other hand, the polymerase chain reaction (PCR) was positive on the three muscles of the infected horse from the IS, identified as the chronic phase of the disease (muscular). In another two horses the result was positive in blood but not in muscles, suggesting that the infection was in an earlier phase; that is to say, the new born larvae were migrating through the blood stream.

Considering the above, it seems that PCR is a technique that is sensitive in both phases; the infection frequency was 4.28%. In relation to the results obtained by PCR in the three horses of the RS, amplification was detected in three muscles of one horse, in only the masseter in the second horse and in the third horse it was found in gluteus and tongue. None were positive in blood.

It is mentioned that it is possible the immune system of the horse destroys the larva partially and this doesn't allow the detection of the parasite in the other muscles.⁶ Also, maybe the parasite load in these animal muscles was below the detection limit of artificial digestion techniques. The frequency of infection detected by PCR in this RS rose to 3.75%. That makes us think that this technique is more sensitive and specific to diagnose the chronic phase of *trichinellosis* of the horse, since it could detect larva in muscle, but not in blood. This also suggests that the positive animals had passed the early phase of infection.

The results suggest that the infection of horses in Mexico is similar to the levels described in other countries of Europe,¹⁵ and in Mexico it has not been sufficiently studied. The PCR technique can be an alternative for the diagnosis of *trichinellosis* in horses slaughtered in Mexican state, private and federal inspection type (TIF) slaughterhouses, because it can detect even seven nanograms of DNA corresponding to 0.06 muscle larvae of *T. spiralis*.⁶

These results are evidence of the presence of *T. spiralis* in horse meat and not just in the back yard pig, as it has already been known in Mexico. From 1970 to 1990, children had to be hospitalized in the "Hospital Infantil de Mexico" because of the seriousness of their

caballo con más de cinco larvas en cada músculo, ello indica que este caballo estuvo altamente infectado; en cambio, en el caballo del matadero rural (MR) sólo se encontró una larva en el masetero, en los demás músculos de este caballo no se detectaron larvas.

Se cree que este método no es el más apropiado cuando existen cargas parasitarias bajas o infecciones tempranas, ya que se deben buscar en más de dos músculos, por ello se supone que sí existe esta parasitosis en los animales destinados al sacrificio en los dos tipos de establecimiento, por el origen o procedencia de los caballos, independientemente de las condiciones sanitarias de matanza, se identifica a la región endémica de donde provienen los caballos con dicha información se identifica la región en que la triquinelosis se presenta, aunque específicamente se cree que aquélla sea la región del sureste de México o de Veracruz.^{13,14}

Por otro lado, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue positiva en los tres músculos del caballo infectado del MI, interpretándose como fase crónica de la enfermedad (muscular), además en otros dos caballos el resultado fue positivo sólo en sangre pero no en músculo, lo que sugiere que la infección se encontraba en una fase temprana; es decir, las larvas recién nacidas se hallaban en la fase de migración por el torrente sanguíneo.

Lo anterior sugiere que la PCR es una técnica igualmente sensible en las dos etapas, la frecuencia de infección fue de 4.28%. En relación con los resultados por PCR con los caballos del MR se observó la amplificación en los seis músculos: dos glúteos, dos maseteros, dos en lengua y ninguno en sangre.

Se menciona que es posible la destrucción parcial de la larva por el sistema inmune del caballo, lo que no permite detectar en los demás músculos.⁶ Además, quizá la carga parasitaria en los músculos de estos animales estuvo debajo del límite de detección de la técnica de digestión artificial. La frecuencia de infección por PCR en este MR se elevó a 3.75%, ello orienta a pensar que esta técnica es más sensible y específica para el diagnóstico de la triquinelosis equina en fase crónica, ya que se pudo detectar presencia de larvas en el músculo, aunque en la sangre no; lo anterior sugiere que habían pasado la etapa temprana de infección.

Los resultados sugieren que la infección del caballo en México es similar a los niveles descritos en otros países de Europa,¹⁵ y que en México no ha sido suficientemente estudiada. La técnica de PCR puede ser una alternativa para el diagnóstico de la triquinelosis en caballos que se sacrifican en los mataderos estatales, privados y los denominados tipo inspección federal (TIF) de México, debido a que puede detectar hasta siete nanogramos de ADN, que

illness. In this sense, the disease has been maintained in its endemic form, according to an epidemiological study done in children, where the presence of specific antibody was demonstrated.¹⁶ Even though in some slaughterhouses the diagnosis of *trichinellosis* is done by the direct demonstration of larvae in muscle biopsies (trichinoscopy),¹⁷ it is evident that this method has its limitations, since low parasitic infections could go on undetected, as it has been demonstrated in this work.

Finally, the use of serological techniques are not very reliable, since there are crossed reactions with antigens from other parasites and because all of them are directed to the diagnosis of the final stages of infection when the parasite is already established in muscle.^{18,19} That is why it has been suggested that molecular biology techniques be used since they are more sensitive and more specific. The frequency of *T. spiralis* was similar between the two slaughterhouses; nevertheless, it was different in relation of the parasite load according to the results obtained with the three diagnostic techniques, amongst which one molecular type technique was included. The results of this work demonstrate the presence of the parasite in horse meat used for human consumption and this represents an important health problem.

Referencias

1. Ortega-Pierres MG, Arriaga C, Yepez-Mulia L. Epidemiology of *Trichinellosis* in Mexico, Central and South America. *Vet Parasitol* 2000;93:201-225.
2. Martínez-Marañón R, Trejo J, Delgado-Aguirre B. Incidence of infection by *Trichinella spiralis* in 1000 cadaver diaphragms in Mexico City during 1972-1973. *Rev Invest Salud Publica* 1974;34:95-105.
3. Ancelle T, Dupouy-Camet J, Desenclos JC, Maillot E, Savage-Houze S, Charlet F, *et al.* A multifocal outbreak of *trichinellosis* linked to horse meat imported from North America to France in 1993. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:615-619.
4. Arriaga C, Yepez-Mulia L, Viveros N, Adame LA, Zarlenga DS, Lichtenfels JR, *et al.* Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *J Parasitol* 1995;81:781-783.
5. Yepez-Mulia L, Arriaga C, Viveros N, Adame A, Benitez E, Ortega-Pierres MG. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horses by ELISA and western blot analyses. *Vet Parasitol* 1999;81:57-68.
6. Viveros N, Arriaga C, Banda V, Ortega-Pierres MG, Yepez-Mulia L. Detection of *Trichinella* infection in slaughter horse by artificial digestion, ELISA and PCR. *Parasite* 2001;8:S257-S259.
7. Arriaga Diaz C, Yepez-Mulia L, Ortega-Pierres MG. Updates on equine *trichinellosis*. *Rev Latinoam Microbiol* 1996;38:139-150.

corresponde a 0.06 larvas musculares de *T. spiralis*.⁶

Estos resultados son evidencia de la presencia de *T. spiralis* en la carne de caballo y no sólo en la del cerdo de traspatio, en donde México tiene antecedentes, los más importantes durante 1970 a 1990 en niños que tuvieron que ser internados en el Hospital Infantil de México por la gravedad de la enfermedad; en este sentido, la enfermedad se ha mantenido en forma endémica de acuerdo con un estudio epidemiológico en niños, donde se demuestra presencia de anticuerpos específicos.¹⁶ Si bien en algunos mataderos el diagnóstico de triquinelosis se realiza mediante la demostración directa de la larva muscular en biopsias de músculo (triquinoscopia),¹⁷ es evidente que este método tiene limitaciones, ya que podrían pasar desapercibidas infecciones parasitarias bajas, como ya se demostró en este trabajo.

Por último, el empleo de técnicas serológicas no son del todo confiables, debido a las reacciones cruzadas con antígenos de otros parásitos y a que todas ellas están encaminadas al diagnóstico tardío de la infección cuando el parásito se ha establecido en el músculo,^{18,19} por lo que se sugiere utilizar técnicas de biología molecular, que son más sensibles y específicas. La frecuencia de *T. spiralis* fue alta y semejante entre los dos mataderos; sin embargo, fue diferente en relación a la carga parasitaria de acuerdo con las tres técnicas de diagnóstico, entre las que se incluyó una de tipo molecular. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la presencia del parásito en la carne de caballos que es utilizada para el consumo humano, lo que representa un problema de salud importante.

8. Samboo KJ, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd ed. New York USA: Cold Spring Harbord Laboratory Press CSH; 1989.
9. Almaraz MG, Jaramillo C, Nicoli TM. Identificación de especie animal como adulterante en chorizo, longaniza y carne para hamburguesa. *Vet Méx* 1995;26:139.
10. Pozio E, Tamburrini A, Sacchi L, Gomez Morales MA, Corona S, Goffredo E, *et al.* Detection of *Trichinella spiralis* in a horse during routine examination in Italy. *Int J Parasitol* 1997;27:1613-1621.
11. Pozio E, Celano GV, Sacchi L, Pavia C, Rossi P, Tamburrini A, *et al.* Distribution of *Trichinella spiralis* larvae in muscles from a naturally infected horse. *Vet Parasitol* 1998;74:19-27.
12. Pozio E, Paterlini F, Pedarra C, Sacchi L, Bugarini R, Goffredo E, *et al.* Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horses. *J Helminthol* 1999;73:233-237.
13. Dupouy-Carnet J. *Trichinellosis*: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol* 2000;93:191-200.

14. Van Knapen F. Control of *trichinellosis* by inspection and farm management practices. *Vet Parasitol* 2000;93:385-392.
15. Sofronic-Milosavljevic L, Pozio E, Patrascu IV, Skerovic N, Gomez Morales MA, Gamble HR. Immunodiagnosis of *Trichinella* infection in the horse. *Parasite* 2001; 8(2suppl):S260-S262.
16. Martínez Barbosa I, Gutiérrez-Quiroz M, Romero Cabello R, Fernando-Presas A, Vázquez Tsuje O, Pérez-León J. Inmunoepidemiología de la triquinelosis en niños de la Ciudad de México. *Rev Pat Clin* 2000;47:156-161.
17. Soule C, Dupouy-Camet J, Georges P, Ancelle T, Gillet JP, Vaissaire J, *et al.* Experimental *trichinellosis* in horses: biological and parasitological evaluation. *Vet Parasitol* 1989;31:19-36.
18. Sofronic-Milosavljevic L, Pozio E, Patrascu IV, Skerovic K, Gomez-Morales MA, Gamble HR. Immunodiagnosis of *Trichinella* infection in the horse. *Parasite* 2001;8 S260-S262.
19. Pozio E, Sofronic-Milosavljevic L, Gomez-Morales MA, Boireau P, Nöcklev K. Evaluation of ELISA and western blot analyses using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Vet Parasitol* 2002;108:163-178.