



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS,
especialidade de Biologia Molecular
em Medicina Tropical e Internacional

AVALIAÇÃO DE ANTIGÉNIOS DE *Trichinella spiralis*
NO DECURSO DA TRIQUINELOSE EM MODELO MURINO

Patrícia Dias Marques



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



AVALIAÇÃO DE ANTIGÉNIOS DE *Trichinella spiralis*
NO DECURSO DA TRIQUINELOSE EM MODELO MURINO

Patrícia Dias Marques

Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia
Molecular em Medicina Tropical e Internacional.

ORIENTADORA:

PROF^a DOUTORA SILVANA BELO

CO-ORIENTADORA:

PROF^a DOUTORA MARIA AMÉLIA GRÁCIO

2008

Índice geral

Agradecimentos.	vii
Resumo.	viii
Abstract.	x
Índice de figuras.	xii
Índice de quadros.	xv
Abreviaturas.	xvi

1. Introdução

	2
1.1 - História de <i>Trichinella</i> spp. e da Triquinelose.	5
1.2 - Caracterização do parasita.	7
1.2.1 – Genótipo <i>Trichinella</i> .	7
1.2.2 – Hospedeiros de <i>Trichinella</i> spp.	7
1.2.3 – Filogenia.	8
1. 2.4 – Morfologia e fisiologia dos parasitas.	9
1. 2.5 – Ciclo de vida de <i>Trichinella</i> spp.	10
1. 2.5.1 – Migração e larvas recém eclodidas (<i>Newborn</i>).	13
1. 2.5.2 – Fase muscular e células hospedeiras (<i>Nurse cells</i>).	13
1.3 - Triquinelose em animais.	16
1.4 - Interação parasita- hospedeiro.	17
1.4.1 – Resposta imune no hospedeiro.	17
1.4.2 – Antigénios e imunidade.	18
1.5 - Infectividade e resistência.	21
1.6 - Resistência ao congelamento.	22

1.7 - Epidemiologia	23
1.7.1 – Triquinelose em habitat silvático.	26
1.7.2 – As relações entre a triquinelose e características do habitat.	27
1.7.3 – Triquinelose em habitat doméstico.	29
1.7.4 – Áreas da EU livres de Triquinelose.	30
1.7.5 – Triquinelose humana na Europa.	30
1.7.6 – Triquinelose em Portugal.	31
1.7.7 – Ausência de Triquinelose no mundo.	33
1.8 – Triquinelose: sintomas.	33
1.9 – Triquinelose: diagnóstico.	34
1.9.1 – Diagnóstico serológico em animais.	35
1.9.2 – Diagnóstico serológico em humanos.	36
1.10 – Diferenciação de espécies de <i>Trichinella</i> por métodos moleculares.	37
2. Justificação e objectivos	39
3. Material e métodos	42
3.1 - Modelo animal.	42
3.2 - Infecção experimental.	43
3.2.1 – Obtenção de larvas enquistadas de <i>Trichinella spiralis</i> .	43
3.2.2 – Preparação da dose infectante.	44

3.3 - Obtenção de antígenos (Ags) de larvas recém-eclodidas (<i>Newborn</i>) e de larvas enquistadas (L1).	45
3.3.1 – Isolamento de larvas <i>Newborn</i> de <i>T. spiralis</i> .	45
3.3.2 – Antígeno de excreção/secreção de larvas <i>Newborn</i> de <i>T. spiralis</i> .	45
3.3.3 – Antígeno total de larvas enquistadas (L1) de <i>T. spiralis</i> (AgT).	46
3.3.4 – Preparação do antígeno de excreção/secreção das larvas enquistadas L1 (AgESL1).	47
3.3.5 – Preparação de antígeno de larvas L1 após incubação em meio de Hank's (AgS).	47
3.3.6 – Concentração de antígeno de excreção/secreção.	47
3.3.7 – Determinação da concentração da proteína dos antígenos.	47
3.4 - Obtenção dos soros para avaliação da reactividade dos antígenos.	47
3.5 - Avaliação dos antígenos por métodos imunológicos.	48
3.5.1. – Reacção de Imunodifusão em gelose.	48
3.5.2 – Reacção de Imunoelectroforese em gelose.	48
3.5.3 – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).	49
3.6 – Avaliação molecular das fracções antigénicas por “Western-blot”.	51
3.6.1 – Electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).	52
3.6.2 – “Immunoblotting”.	52
3.7 - Análise estatística.	54
	56

4. Resultados

4.1 – Obtenção de parasitas adultos <i>T.spiralis</i> .	56
4.2 – Determinação da concentração proteica dos antígenos.	57
4.3 – Avaliação imunológica dos antígenos.	58
4.3.1 – Análise da sensibilidade e especificidade dos antígenos.	58
4.3.2 – Análise da cinética dos anticorpos IgG, IgG1 e IgM anti- <i>T. spiralis</i> durante o período de infecção.	59
4.4 – Separação das proteínas antigénicas por SDS-PAGE.	69
4.5 – Avaliação da reactividade das fracções antigénicas por “Western-blot”.	72
4.5.1 – Antígeno total das larvas L1-AgT.	72
4.5.2 – Antígeno de larvas L1 após incubação-AgS.	75
5. Discussão e Conclusões	81
6. Referências bibliográficas	89

Agradecimentos

- À minha orientadora Professora Doutora Silvana Belo pela ajuda na planificação, empenho na orientação deste trabalho e disponibilidade científica;
- À professora Doutora Maria Amélia Grácio, pelos ensinamentos e pela sua disponibilidade ao longo da realização deste trabalho;
- À investigadora Alcione Trinca pelo carinho, apoio pessoal e pela disponibilidade científica;
- À técnica Isabel Clemente, incansável nos ensinamentos e apoio técnico;
- Aos mestres Pedro Ferreira e Cátia Ferreira pela disponibilidade e apoio;
- A todos os colaboradores da unidade de Helminologia e Malacologia Médica;
- À Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM/FCT/IHMT) pelo suporte financeiro de parte deste trabalho;
- Às colegas do I Mestrado de Ciências Biomédicas, Ana Carina e Ana Isabel Reis pela paciência e apoio;
- Às minhas colegas e companheiras que partilharam comigo bons e maus momentos, Mariana Reis e Sílvia Beato;
- Aos meus pais, pela paciência e pelo apoio familiar.

Resumo

A triquinelose é uma zoonose, actualmente considerada uma doença emergente e/ou re-emergente. Novas fontes de infecção humana resultam do consumo de carne de veado e de cavalo parasitada, apesar da maioria das infecções continuar a ser causada pela carne de porco e de javali. Portugal apresenta um risco potencial, devido ao aumento da criação de porcos em regime extensivo, à confirmação da existência de *Trichinella* spp. em ciclo silvático e à localização contígua a Espanha onde a zoonose é endémica.

No presente estudo procedeu-se à avaliação imunológica de antígenos produzidos de diferentes fases do ciclo de *T. spiralis* e à identificação de anticorpos expressos durante o período de infecção em roedores, com o objectivo de contribuir para a melhoria dos métodos serológicos.

Das larvas da fase muscular (L1) e de larvas recém eclodidas e/ou em fase de migração (larvas “Newborn” – LNB), produziram-se antígenos somáticos (AgT e AgS, de larvas L1) e antígenos de excreção-secreção (ES), AgESLNB e AgESL1. Os vermes adultos obtidos foram insuficientes para a produção do antígeno.

Comparando os resultados obtidos pelo método de ELISA, foi evidente a qualidade superior do antígeno somático L1 (AgT) tanto a nível da sensibilidade como da especificidade e, em particular, na detecção da IgG anti-parasita. Com os outros anticorpos, IgM e IgG₁, verificaram-se reacções cruzadas com *Toxocara canis* com todos os antígenos. Ao comparar-se os níveis dos anticorpos expressos ao longo dos 60 dias de infecção, apenas com os antígenos somáticos (AgT e AgS) se detectou um aumento significativo do título de anticorpos correspondente ao tempo de infecção.

No *Immunoblotting*, o maior número de fracções antigénicas reactivas, com pesos moleculares entre 15 a 250 KD, foi detectado nos antígenos somáticos. As fracções de 49, 68 e 250 KD foram as mais frequentemente reconhecidas (IgG e IgM anti-*T. spiralis*). O predomínio de certas fracções antigénicas reactivas, de pesos moleculares entre 32-35 KD, 43-45KD, 49 KD e 97-105 KD, também identificadas no diagnóstico da infecção por outras espécies de *Trichinella* e em

diferentes hospedeiros, parece-nos de elevada importância, uma vez que a sua caracterização poderá contribuir para o desenvolvimento de testes serológicos de maior reprodutibilidade.

Abstract

Trichinellosis is a parasitic zoonosis transmitted to humans through consumption of raw or undercooked meat (e.g. pork, horse and game meat) containing infective larvae of *Trichinella* spp. Current evidence suggests that human trichinellosis is emerging/re-emerging in recent years throughout the world. There is a potential risk for trichinellosis transmission in Portugal, mainly due to changes in pig production practices, the presence of sylvatic species of *Trichinella* and the vicinity of endemic foci in Spain. The aims of the present study were to evaluate the diagnostic performance of four *T. spiralis* antigenic preparations produced from muscular (L1) and newborn larvae (NBL), obtained from experimental infected Wistar rats.

Somatic antigens (AgT and AgS) were prepared from L1 *T. spiralis* and excretory/secretory (ES) antigens were obtained from both NBL (AgESNBL) and L1 larvae (AgESL1). Antigens from adult worms were not produced due to the insufficient amount of parasites recovered.

All antigens (AgT, AgS, AgESNBL and AgESL1), were tested by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Immunoblotting (IB) for detection of IgG, IgM and IgG₁ anti-*T. spiralis* antibodies during the experimental period (60 days). Increased sensitivity and specificity were achieved with somatic antigens, in particular with AgT/ELISA system for detection of circulating IgG antibodies, while cross reactivity with *Toxocara canis* were detected with all antigens when tested for IgM and IgG₁ isotypes. Moreover, early detection and increasing levels of anti-parasite IgG antibodies with the time of infection were most significant when somatic antigens (AgT and AgS) were used.

A panel of protein fractions ranging from 15 to 250 KD were recognized by IgG and IgM antibodies, however only polypeptides of 49, 68 and 250 KD were reactive with both antibodies.

Some clusters of antigens, in particular those of 32-35 KD, 43-45, 49 KD and 97-105 KD seems to be prominent in other *Trichinella* species infecting distinct hosts, including humans, as demonstrated by other investigators. Molecular characterization of these polypeptides and the development of new tools, such as recombinant-based protein antigens, could be an important

approach to improve reproducible serological tests, which will enable an early and specific diagnosis of trichinellosis caused by *Trichinella* spp. worldwide.

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição das várias espécies de <i>Trichinella</i> a nível mundial.	3
Figura 2 – Espécies e genótipos de <i>Trichinella</i> , distribuição e hospedeiros.	8
Figura 3 – Dendograma reconstruído a partir de todas as espécies enquistadas e não enquistadas e genótipos de <i>Trichinella</i> com base na variação mitocondrial <i>LSU</i> e <i>COI</i> DNA e Subunidade <i>rDNA</i> .	9
Figura 4 – Parasita adulto fêmea.	10
Figura 5 – Parasita adulto macho.	11
Figura 6 – Ciclo de vida da <i>Trichinella</i> .	12
Figura 7 – Evolução e enquistamento das larvas L1 de <i>Trichinella</i> .	15
Figura 8 – Distribuição mundial da <i>Trichinella spiralis</i> .	23
Figura 9 – Distribuição mundial <i>Trichinella nativa</i> , <i>Trichinella nelsoni</i> , <i>Trichinella murreli</i> .	24
Figura 10 – <i>Trichinella</i> designada como <i>T6</i> , <i>T9</i> , <i>T8</i> e <i>T. brivoti</i> .	24
Figura 11 – Existem três espécies não encapsuladas de <i>Trichinella</i> .	24
Figura 12 – Distribuição da triquinelose em países da UE.	26
Figura 13 – A ecologia da triquinelose na região espanhola da Estremadura.	28
Figura 14 – Sumário de sinais e sintomas, resultados laboratoriais e testes de diagnóstico em pacientes com triquinelose.	34
Figura 15 – Ratos mantidos no biotério.	42
Figura 16 – Parasita adulto fêmea de <i>T. spiralis</i> .	56
Figura 17 – Parasita adulto macho de <i>T. spiralis</i> .	56

Figura 18 – Sensibilidade dos quatro antígenios.	58
Figura 19 – Especificidade dos quatro antígenios.	58
Figura 20 – Cinética dos anticorpos IgG anti- <i>T. spiralis</i> /AgT no período de infecção.	59
Figura 21 – Expressão dos níveis IgG com AgS/ELISA durante o período de infecção.	60
Figura 22 – Níveis séricos de IgG detectados com AgESL1/ELISA no período de infecção.	61
Figura 23 – Expressão dos anticorpos IgG anti- <i>T. spiralis</i> com AgESLNB.	61
Figura 24 – Análise da resposta humoral (IgG) anti- <i>T. spiralis</i> utilizando quatro antígenios.	62
Figura 25 – Densidades ópticas determinadas pelo método de ELISA para imunoglobulina IgG ₁ utilizando o AgT em diferentes dias de infecção.	63
Figura 26 – Densidades ópticas determinadas pelo método de ELISA para imunoglobulina IgG ₁ utilizando o AgS em diferentes dias de infecção.	63
Figura 27 – Evolução de IgG ₁ utilizando o AgESL1 durante o período de infecção.	64
Figura 28 – Evolução de IgG ₁ utilizando o AgESLNB durante o período de infecção.	64
Figura 29 – Análise da resposta humoral (IgG ₁) anti- <i>T. spiralis</i> em ratos.	65
Figura 30 – Cinética dos anticorpos IgM anti- <i>T. spiralis</i> /AgT no período de infecção	66
Figura 31 – Expressão dos níveis de IgM com AgS/ELISA no período de infecção.	67
Figura 32 – Análise da resposta humoral (IgM) anti- <i>T. spiralis</i> em ratos.	68
Figura 33 – Análise electroforética dos quatro antígenios em SDS-PAGE.	69
Figura 34 – Análise electroforética dos quatro antígenios em SDS-PAGE (em baby gel).	70
Figura 35 - Análise electroforética dos quatro antígenios em SDS-PAGE num gel a 10%.	71
Figura 36 – Identificação das proteínas de <i>T. spiralis</i> reconhecidas por anticorpos IgG utilizando AgT.	72

Figura 37 – Identificação das proteínas de <i>T.spiralis</i> reconhecidas por anticorpos IgM utilizando AgT.	73
Figura 38 – Frequência das fracções antigénicas do AgT reactivas para IgG.	74
Figura 39 – Frequência das fracções antigénicas do AgT reactivas para IgM.	75
Figura 40 – Identificação das proteínas de <i>T.spiralis</i> reconhecidas por anticorpos IgG utilizando AgS.	77
Figura 41 – Identificação das proteínas de <i>T.spiralis</i> reconhecidas por anticorpos IgM utilizando AgS.	78
Figura 42 – Percentagem de fracções proteicas do AgS que reagiram com anticorpos IgG nos ratos infectados.	79
Figura 43 – Percentagem de fracções proteicas do AgS que reagiram com anticorpos IgM nos ratos infectados.	79

Lista de Quadros

Quadro 1 – Variabilidade na sobrevivência de <i>T. brivoti</i> na carne congelada de porco e Javali.	23
Quadro 2 – Concentração proteica dos diferentes antígenos.	58
Quadro 3 – Mediana das densidades ópticas de IgG em relação aos quatro antígenos e ao período de infecção.	63
Quadro 4 - Mediana das densidades ópticas de IgG ₁ em relação aos quatro antígenos e ao período de infecção.	66
Quadro 5 – Mediana das densidades ópticas dos quatro antígenos anti-IgM.	69
Quadro 6 – Antígenos e respectivas bandas moleculares.	71
Quadro 7 – Antígenos e respectivas bandas moleculares em gel 12,5%.	72
Quadro 8 – Antígenos e respectivas bandas moleculares num gel a 10%.	72
Quadro 9 – Reactividade no Immunoblotting de anticorpos IgG presentes nos ratos infectados por <i>T. spiralis</i> em diferentes dias pós infecção utilizando o AgT.	74
Quadro 10 – Reactividade do AgT- IgM anti- <i>T.spiralis</i> por <i>Immunoblotting</i> durante a infecção.	75
Quadro 11 – Reactividade das fracções do AgS para IgG em diferentes dias pós infecção.	76
Quadro 12 – Reactividade das fracções do AgS para IgM em diferentes dias pós infecção.	77

Abreviaturas

Ags – Antígenos

AgESL1 – Antígeno de excreção-secreção de larvas L1

AgESLNB – Antígeno de larvas recém eclodidas (*Newborn*)

AgS – Antígeno somático de larvas L1 após incubação

AgT – Antígeno total de larvas L1

CK – Creatinina- Kinase

COI – Citocromo - oxidase I

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ES –Excreção-secreção

IB –*Immunoblotting*

IL – Interleucina

INF- γ – Interferão-gama

L1 – Larvas enquistadas

KD – Kilodalton

LNB –Larvas *newborn*

LSU – Sub-unidade grande de DNA ribossomal

Newborn – Larvas recém eclodidas e em migração

Nurse cell – Célula hospedeira

SSU – Sub-unidade pequena de DNA ribossomal

UE – União Europeia

1-INTRODUÇÃO

1. Introdução

A triquinelose é uma zoonose com distribuição mundial causada por nemátodes do género *Trichinella*. A infecção humana ocorre após o consumo de carne de porco crua ou insuficientemente cozida e/ou produtos derivados deste, assim como através da carne de javali, veado e cavalo. Esta doença pode ser fatal, uma vez que este parasita pode induzir encefalite ou miocardite.

A triquinelose é uma doença cosmopolita, sendo um problema de saúde pública na Europa Oriental e Meridional, assim como na América do Norte, podendo ainda ser encontrada na região Ártica. Há focos endémicos em países da África, da América Latina e do sul da Ásia. Nunca foi, no entanto, registada no Brasil (Rey, 2001). Estima-se que aproximadamente 11 milhões de pessoas possam estar cronicamente infectadas através da persistência de larvas nos músculos, as quais provocam dores musculares (Dupoy-Camet, 2000).

O género *Trichinella* tem uma grande variedade de hospedeiros e uma distribuição geográfica extensa. Cerca de 150 espécies de mamíferos, assim como aves e répteis têm sido encontradas naturalmente infectadas (Bolas-Fernandez & Wakelin, 1989 e Pozio, 2005). Também foram referidos casos de peixes como hospedeiros (Morretti *et al.*, 1997) embora em infecções experimentais não tenha sido comprovada a sua susceptibilidade (Pozio, 2005).

Taxonomicamente o género *Trichinella* pertence: (NCBI Taxonomy Browser, 2008)

- Filo: *Nematoda*
- Classe: *Enoplea*
- Subclasse: *Enoplia*
- Ordem: *Trichocephalida*
- Família: *Trichinellidae*

Conhecem-se, até ao presente, 11 genótipos de *Trichinella* (Pozio *et al.*, 2002a) distribuídos por zonas climáticas e/ou por outras espécies de hospedeiros, tendo sido identificadas oito espécies: *Trichinella spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis* e *T. pseudospiralis* (Figura 1). *T. nativa* encontra-se em zonas árticas e em ciclos silváticos, enquanto que a *T. nelsoni* ocorre em África e *T. spiralis* apresenta essencialmente um ciclo doméstico.

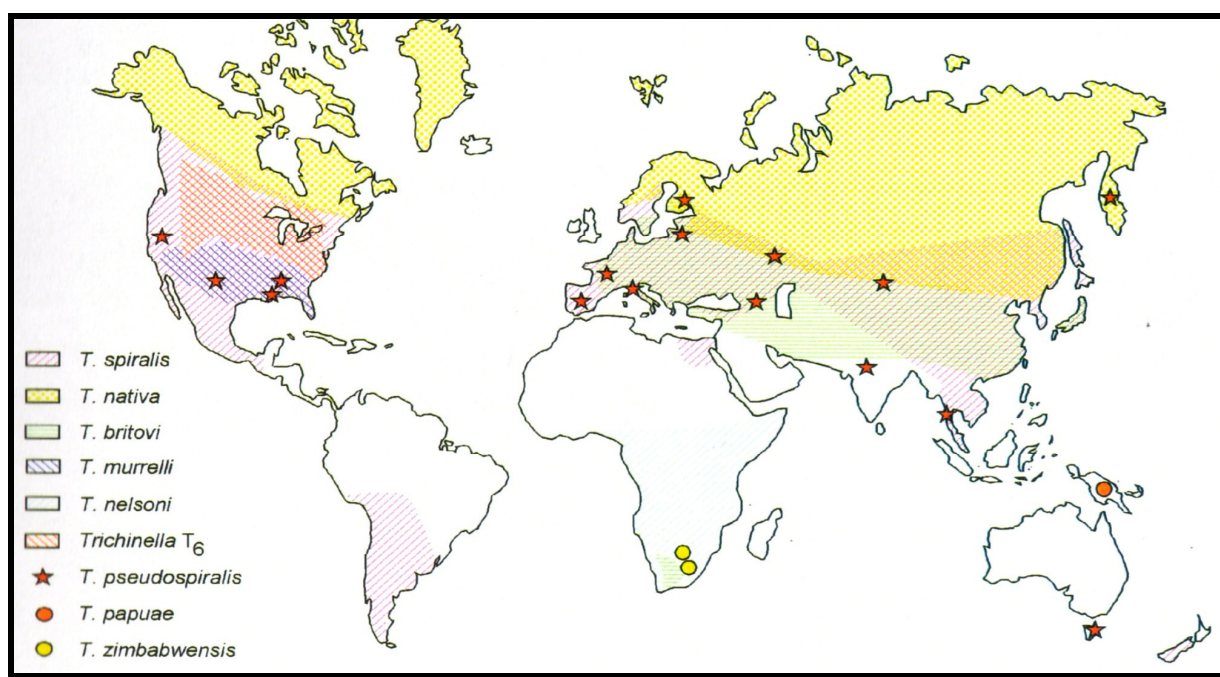


Figura 1 – Distribuição das várias espécies de *Trichinella* a nível mundial (<http://www.med.unipi.it>)

Segundo Dupouy-Camet (2000), embora não tenham sido referidos casos humanos para certos genótipos, todas as espécies de *Trichinella* são patogénicas para o homem, sendo observadas diferenças entre espécies ou genótipos em termos de sinais e/ou sintomas clínicos.

A triquinelose é considerada uma parasitose emergente que está em expansão na Europa por diversas razões, uma das quais o consumo de carne de cavalo. Com a entrada dos novos países de leste, nomeadamente a Macedónia, a Croácia e a Sérvia para a União Europeia (UE), onde existe o hábito de alimentar os cavalos, sobretudo os pôneis em idades precoces, com carnes de outros animais, verificou-se um aumento da parasitose nalguns países da UE. Com efeito, a exportação

destes animais para países consumidores de carne de cavalo, como a França e a Suíça, tem sido referido como um dos factores responsáveis pelo aumento dos casos de infecção humana nesses países (Pozio, 1998).

Há vários casos e surtos localizados na Europa, devido por exemplo, ao fenómeno crescente da caça turística, atingindo alguns caçadores que trouxeram para consumo próprio enchidos preparados com carne desses animais. Este é um problema que se pode colocar em Portugal e em Espanha. Aparentemente, não existem casos humanos recentes referenciados em Portugal, pelo menos diagnosticados clinicamente. No entanto, a zona de Portugal que raia com Espanha poderá ser uma região endémica para a triquinelose, de acordo com Pozio (1998).

Assim, a re-emergência desta infecção zoonótica em várias partes do mundo, vem alertar para a necessidade de uma vigilância persistente a esta parasitose.

1.1 História de *Trichinella* spp. e da Triquinelose

Trichinella spiralis foi descoberta em Londres no ano de 1835, por James Paget, um estudante de medicina, quando procedia a uma dissecação de tecido muscular humano. Precedendo a observação de Paget, houve algumas descrições de estruturas de forma oval em amostras musculares, tendo sido posteriormente designadas como cápsulas de *Trichinella* (Gould, 1970).

Para alguns parasitologistas, a justificação de certos tabus alimentares como a proibição religiosa de comer carne de porco, contida no Levítico e no Deuteronômio, teria sido devida à triquinelose que incidiria intensamente entre os hebreus, na época em que os textos bíblicos estavam a ser codificados (Gould, 1970).

Em 1835, Sir Richard Owen atribuiu a este nemátode o nome de *Trichina spiralis* (Gould, 1970). Uma vez que o nome *Trichina* foi dado previamente a um género de moscas, Railliet em 1895 atribuiu a designação de *Trichinella* ao nemátode (Gould, 1970).

Em 1846, Joseph Leidy ao encontrar quistos de *Trichinella* em músculos de porco, identificou-os facilmente como o organismo observado várias vezes em humanos nas salas de autópsia (Gould, 1970).

Herbest foi o primeiro a referir que este parasita podia invadir os músculos através do consumo de carne contendo larvas de *Trichinella* enquistadas, ao encontrar estes quistos em gatos em 1845, tendo procedido à primeira infecção experimental em um texugo e em cães. No fim de 1850, Leuckart e Virchow realizaram infecções experimentais alimentando cães com músculos de carne humana infectada, de forma a descobrir o ciclo de vida da *Trichinella* (Gould, 1970).

Em 1860, a triquinelose foi reconhecida como sendo uma doença fatal para os humanos. Zenker observou um grande número de quistos de *Trichinella* em amostras musculares durante a realização de uma autópsia numa mulher, de 20 anos que tinha falecido 33 dias após ter adoecido, o que aconteceu quatro dias após ter comido carne de porco. A observação de parasitas adultos, mostrou que o desenvolvimento do ciclo ocorreu no próprio hospedeiro (Gould, 1970).

Segundo Blancou (2001) muitos milhares de pessoas terão sido infectadas, no mesmo período, em países Europeus e centenas delas terão morrido em consequência da parasitose.

Após o ciclo de vida da *Trichinella* e a sua associação à ingestão de carne serem conhecidos, o passo seguinte direccionou-se para a protecção dos consumidores, com a obrigatoriedade do exame microscópico da carne de porco. Iniciado na Prússia em 1879, apesar de em 1863 já ser praticado em algumas províncias, a inspecção era realizada através da compressão das amostras entre dois vidros (Gould, 1970).

1.2. Caracterização do parasita

1.2.1 Genótipo *Trichinella*

Os parasitas do género *Trichinella* alternam o seu ciclo de vida em fase intestinal e fase músculo-esquelética no mesmo hospedeiro. O género *Trichinella* apresenta duas subdivisões: as espécies que ao invadir as células musculares ficam rodeadas de uma cápsula de colagénio (enquistamento) e outras onde não ocorre enquistamento (Zarlenga *et al.*, 2004). O grupo onde ocorre enquistamento integra cinco espécies e três genótipos (ainda não definidos taxonomicamente) que parasitam apenas mamíferos. Historicamente, das espécies que enquistam, *T. spiralis* é a maior causadora de infecções humanas. Deste grupo fazem ainda parte, *T. nativa* (inclui o genótipo *Trichinella* T6), *T. brivoti* (inclui dois genótipos separados, *Trichinella* T8 e T9), *T. murrelli* e *T. nelsoni* (Murrell *et al.*, 2000 e La Rosa *et al.*, 2003).

O grupo onde não existe a formação da cápsula é constituído por três espécies: *T. pseudospiralis*, *T. papuae* e *T. zimbabwensis*. Estas duas últimas espécies, apresentam como característica, o facto do seu ciclo de vida ser completado independente da temperatura corporal do hospedeiro.

1.2.2 Hospedeiros de *Trichinella* spp.

Trichinella spp. tem uma grande variedade de hospedeiros. Alguns destes hospedeiros como os guaxinis, os murganhos e os humanos, são permissivos à infecção por diversas espécies de *Trichinella* (Pozio *et al.*, 1992a e Oivanen *et al.*, 2002). Outros, como os ratos e os porcos são mais selectivos, enquanto que *Trichinella nativa* possui menor poder infectante (Pozio *et al.*, 1992a).

As espécies que não enquistam têm diferentes capacidades infectantes, *T. pseudospiralis* infecta mamíferos e aves, enquanto que *T. papuae* e *T. zimbabwensis* infectam mamíferos e répteis

(Kapel *et al.*, 1998a, Pozio *et al.*, 1999, 2002a, 2004 e Pozio, 2005) como elucida a Figura 2. Os mamíferos marinhos também podem ser infectados (Forbes, 2000).

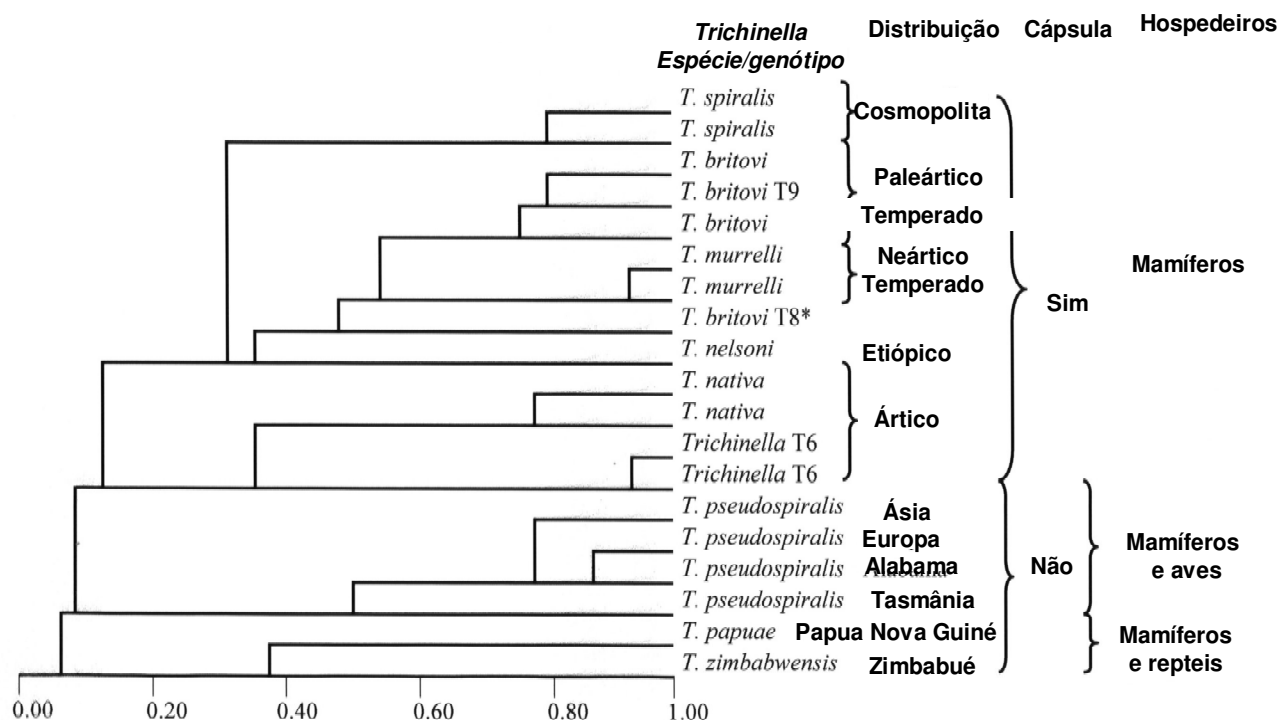


Figura 2 – Espécies e genótipos de *Trichinella*, distribuição e hospedeiros (Adaptado www.med.unipi.it).

1.2.3 Filogenia

Os parasitas do género *Trichinella* são morfologicamente indistinguíveis (Dick, 1983; Lichtenfels *et al.*, 1983 e Pozio *et al.* 1992b), recorrendo-se ao uso de métodos bioquímicos e ou genéticos para a sua classificação (Figura 3).

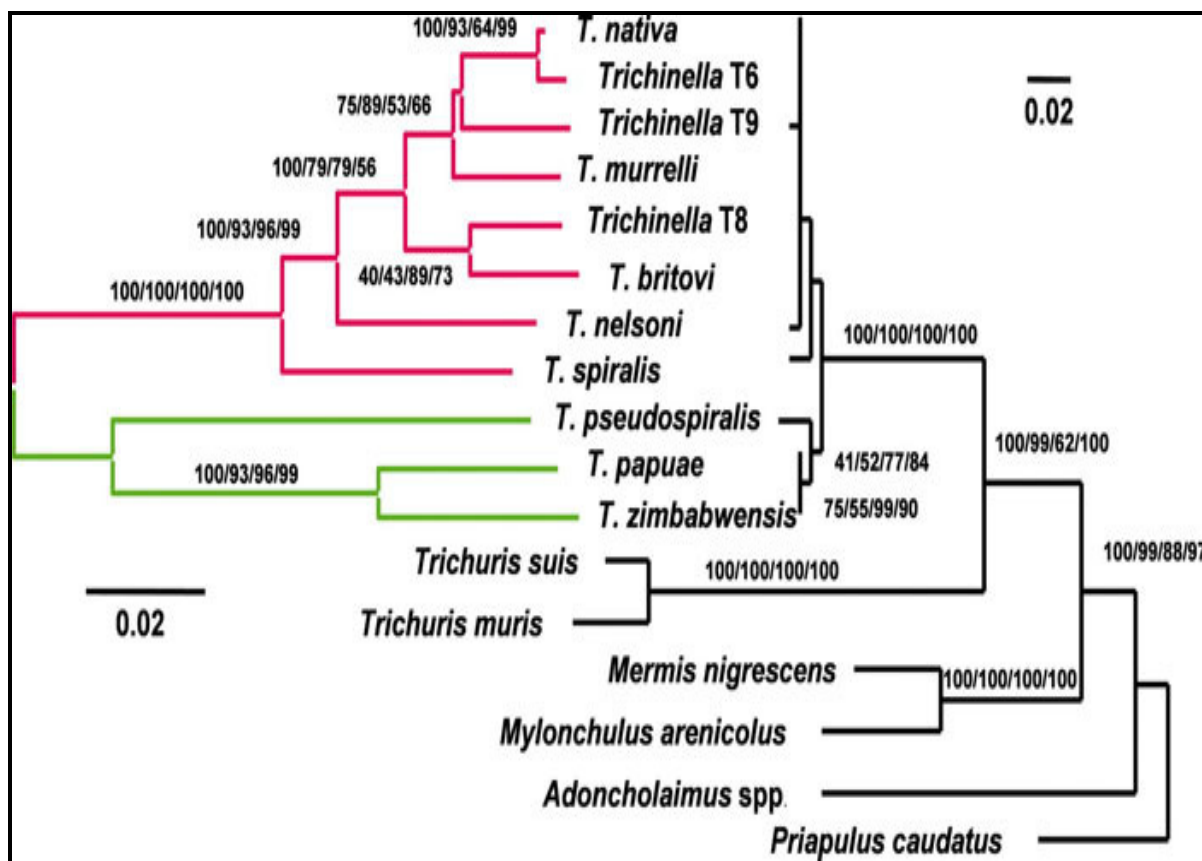


Figura 3 – Dendrograma reconstruído a partir de todas espécies enquistadas (vermelho) e não enquistadas (verde) e genótipos de *Trichinella* com base na variação mitocondrial LSU e COI DNA (esquerda) e Sub-unidade (SSU) rDNA (direita) <http://www.wormbook.org/>

1.2.4 Morfologia e fisiologia dos parasitas

Os parasitas adultos de *T. spiralis* são muito pequenos (fêmeas com 3 a 4 mm e machos 1.4-1.6 mm de comprimento), delgados e cilíndricos. A boca é simples e conduz ao esôfago, que se encontra parcialmente na parte muscular e outra parte contida no esticossoma.

A fêmea é vivípara e as larvas saem pelo orifício vulvar, situado na metade anterior do corpo. (Figura 4). O ânus é terminal em ambos os sexos, sendo a extremidade posterior do macho provida de duas papilas cónicas, designadas por apêndices copuladores. Por entre eles sai a parede da cloaca, quando em protrusão para a cópula. (Figura 5).

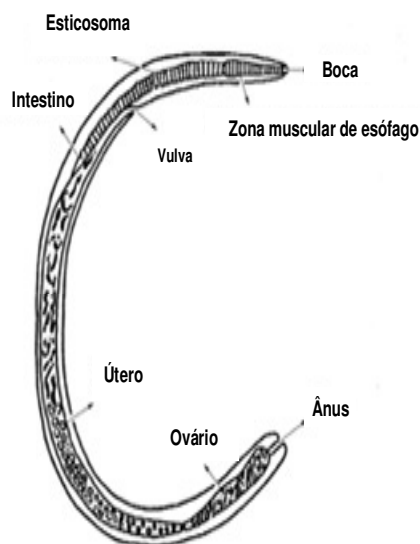


Figura 4 – Parasita adulto fêmea

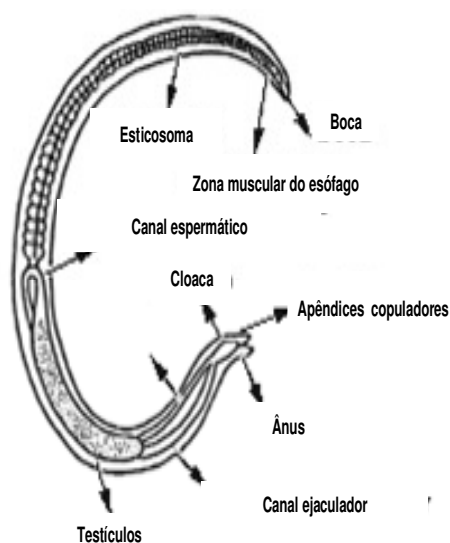


Figura 5 – Parasita adulto macho

1.2.5 Ciclo de vida de *Trichinella* spp. (Figura 6)

Todos os estádios do desenvolvimento de *Trichinella* ocorrem num único hospedeiro. Após a ingestão da carne contendo as larvas de *Trichinella*, a larva é libertada da sua cápsula durante o processo de digestão. Estas larvas vão depois penetrar nas células epiteliais colunares do intestino delgado. O desenvolvimento do estadio de adulto (de L1 a L5) no nicho intra-multicelular é rápido, aproximadamente 30 horas (Despommier, 1983). Após a cópula o macho morre ou é eliminado e a fêmea inicia a produção de larvas (Soulsby, 1982). Os ovos encontram-se dentro do útero e a larva L1 tem aproximadamente 0.1mm de comprimento quando eclode.

Das larvas produzidas, algumas são eliminadas pelas fezes. Porém, a maioria alcança os capilares sanguíneos ou linfáticos. As que entram no sistema porta atravessam o fígado e chegam à grande circulação. No entanto, podem permanecer nos tecidos algum tempo e depois voltarem à circulação.

Somente as larvas que chegarem ao tecido muscular esquelético têm hipótese de prosseguir o ciclo. Deixando os capilares, elas vão localizar-se no interior das fibras musculares (que naturalmente ficam condenadas à destruição), crescem durante um mês, passando de 0,1 mm para 1mm. Nesse período sofrem três mudas. Depois enrolam-se em espiral, sendo envolvidas por uma cápsula fibrosa (produto de reação do hospedeiro) de forma elíptica e com eixo orientado no sentido geral das fibras musculares.

Nessas condições, permanecem vivas durante muitos meses ou anos (5 a 10 anos, nos humanos) sem apresentar qualquer desenvolvimento.

Se a carne contendo os quistos larvares for ingerida por outro hospedeiro, os parasitas são libertados no estômago, pelo processo digestivo. Seguidamente passam para o duodeno, penetram a mucosa, e nela sofrem a quarta e última muda, 2 a 3 dias depois da infecção, completando assim a sua diferenciação em machos e fêmeas adultos. A produção de larvas começa entre o 4º e o 7º dia depois da fecundação, persistindo durante várias semanas (Figura 6).

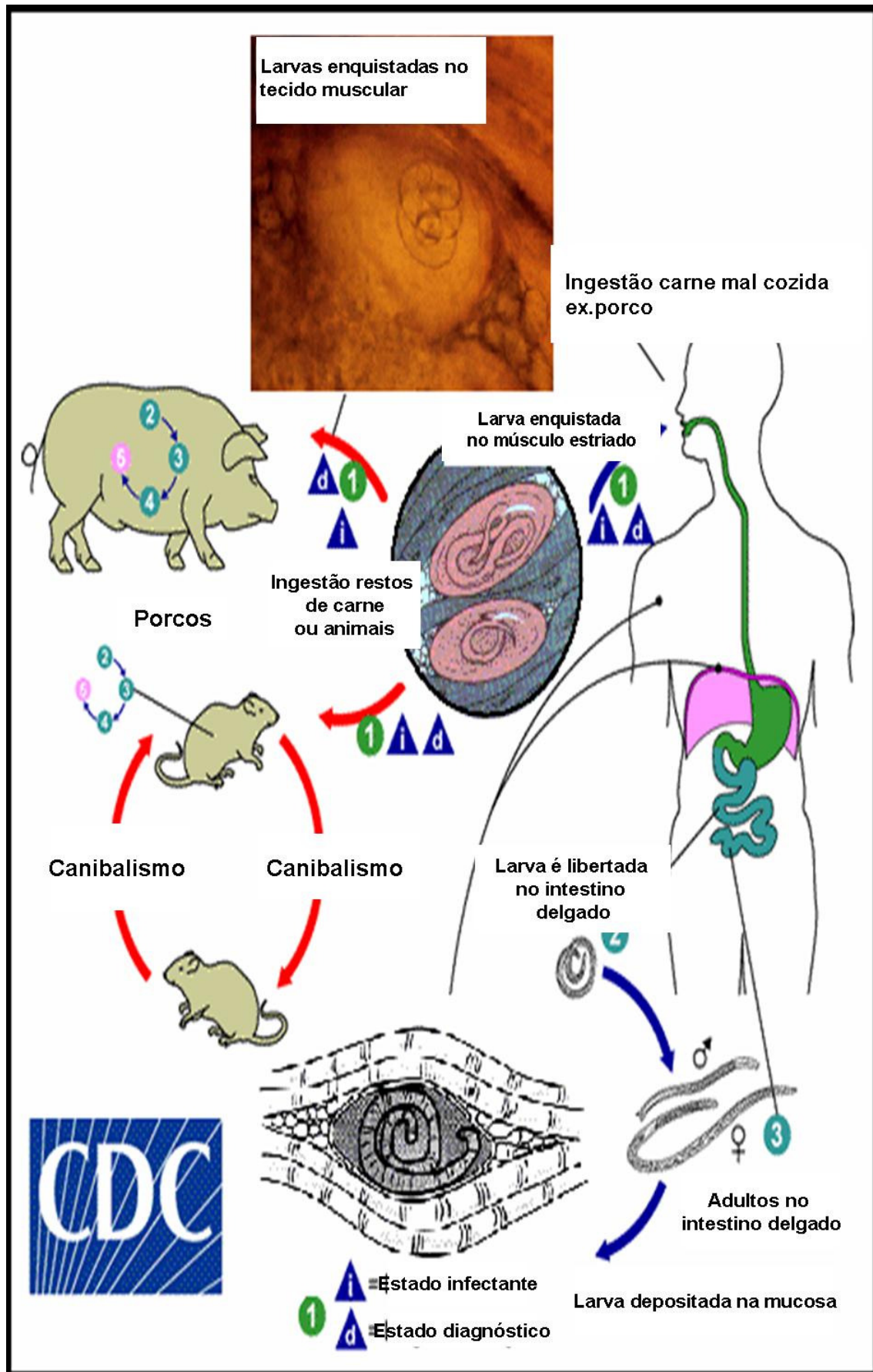


Figura 6 – Ciclo de vida da *Trichinella* (Adaptado: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>)

1.2.5.1 Migração e larvas recém eclodidas (*Newborn*)

A produção de larvas começa uma semana após infecção e continua várias semanas. Contudo, as fêmeas são mais fecundas durante a primeira semana de produção larvar (Marti & Murrell, 1986). A sua fecundidade depende da espécie de *Trichinella*, assim como da localização no intestino delgado. Alguns estudos demonstraram que as fêmeas recolhidas a partir do jejuno produziam mais larvas do que as recolhidas a partir do íleo (Sukhdeo, 1991). As larvas recém eclodidas (*Newborn* -LNB) entram na linfa, chegam à circulação e espalham-se por todo o corpo.

1.2.5.2 Fase muscular e células hospedeiras (*Nurse cells*)

Quando entram nos músculos as larvas de *T. spiralis* causam danos, primeiro nos capilares e depois nas células musculares. A capilaridade é reparada sem angiogénese porque o dano é minorado. As proteínas específicas do músculo, como a creatinina kinase (CK) e a mioglobina, são libertadas em grande quantidade em infecções humanas (Capo *et al.*, 1998).

As larvas iniciam o enrolamento dentro da *nurse cell* onde vão crescer (Soulsby, 1982). O crescimento é rápido, iniciando-se a partir do terceiro dia até a várias semanas após a entrada no músculo (Despommier *et al.*, 1991). Assim, o núcleo das células infectadas aumenta de volume atingindo um tamanho máximo ao fim de oito dias. Cada célula hospedeira (*nurse cell*) contém cerca de 40 núcleos derivados de miócitos (Despommier *et al.*, 1991). Recentemente a expressão apoptose tem sido referida como o regulador durante a transformação da célula muscular, sugerindo o seu envolvimento na formação da *nurse cell* (Wu *et al.*, 2005). De acordo com Beiting *et al.*, (2004) o infiltrado celular inflamatório à volta da *nurse cell* é, na sua maioria, constituído por células mononucleares controladas por interleucina 10 (IL-10).

A angiogénese à volta de *nurse cell* inicia-se aproximadamente 12 dias após infecção, sendo precedida por uma situação de hipóxia, com fenómenos de auto-regulação através de factores endoteliais vasculares de crescimento. Assim, à medida que o parasita e a *nurse cell* crescem, a hipóxia e a necessidade de nutrientes aumentam continuando a neovascularização. Algumas vezes o parasita estimula a *nurse cell* a sintetizar colagénio IV e VI formando uma cápsula à volta desta (Polvere *et al.*, 1997 e Capo *et al.*;1998).

O metabolismo de infecção da larva L1 é anaeróbio. Assim, o parasita tem de segregar proteínas constantemente de forma a manter a *nurse cell* num estado de diferenciação (Capo *et al.*, 1998). O metabolismo anaeróbio é valioso quando o hospedeiro morre, pois o parasita permanece infectante até ser ingerido por outro hospedeiro (Despommier, 1998).

O desenvolvimento do ciclo da *nurse cell* varia, dependendo da espécie de *Trichinella*. *T. nativa* é a que encapsula mais rapidamente, com a formação da *nurse cell* entre 20 a 30 dias após infecção. *T. murrelli* é a mais lenta na formação de *nurse cells* aproximadamente 60 dias. A formação das *nurse cells* é detectada na *T. spiralis* 16 dias pós-infecção, enquanto que na *T. nelsoni* ocorre 34 dias de após infecção (Pozio *et al.*, 1992b). As diferenças no tempo de enquistamento parecem resultar de diferenças na reprodução e na maturação, uma vez que a formação da cápsula inicia-se 9 dias após a chegada de larvas recém eclodidas e em migração ao músculo (Li & Ko, 2001). Uma vez no músculo, *Trichinella* pode sobreviver vários anos antes de ser ingerida e iniciar-se o ciclo novamente noutra hospedeiro (Figura 7).

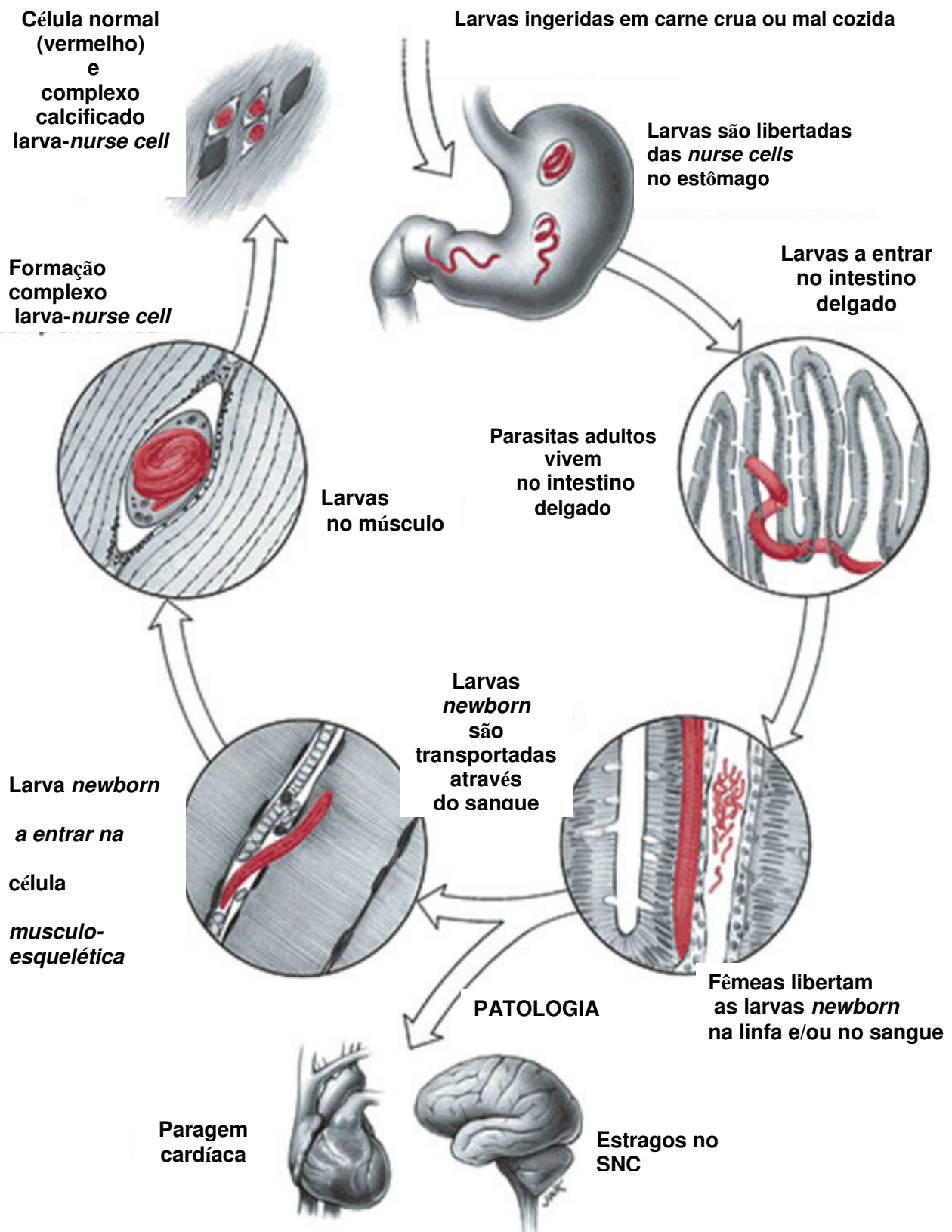


Figura 7 –Evolução e enquistamento das larvas L1 de *Trichinella*. Adaptado <http://www.wormbook.org/>

1.3 Triquinelose em animais

A infecção por *Trichinella* raramente causa sinais clínicos em hospedeiros naturais do parasita, mesmo quando são infectados com um número elevado de larvas (Bruschi & Murrel, 2002). Em investigação, o ciclo de vida da *Trichinella spp.* é mantido em animais de laboratório, estando a infecção bem definida para murganhos e ratos (Stewart *et al.*, 1978; Bell, 1998; Torrents & Vergara, 2000 e Malakauskas *et al.*, 2001)., uma vez que a refrigeração reduz a capacidade de infecção e a sobrevivência. Os ratos são excelentes hospedeiros para *T. spiralis*, *T. brivoti* e *T. pseudospiralis*, enquanto que *T. nativa* não se reproduz bem nestes hospedeiros (Malakauskas *et al.*, 2001). Os ratos são assintomáticos excepto no aumento de consumo de comida e ganho de peso durante as primeiras semanas de infecção com uma dose de 7500 larvas de *T. spiralis* (Torrents & Vergara, 2000).

Outras infecções experimentais em outros animais revelaram diferenças entre hospedeiros (Kapel *et al.*, 1998a e Pozio *et al.*, 2004), contribuindo para clarificar o ciclo infeccioso na fauna local e o potencial risco para humanos. Alguns estudos experimentais de infecção de *Trichinella* em porcos tem ajudado a perceber a distribuição de larvas nos músculos, a resposta imunológica e os sinais clínicos (Kapel *et al.*, 1998b e Kapel & Gamble, 2000). Mesmo quando a dose de infecção é alta, os sinais clínicos não aparecem necessariamente nestes animais. *T. spiralis* infecta os porcos muito eficientemente, enquanto que *T. brivoti*, *T. nelsoni* e *T. pseudospiralis* de forma moderada.

Estudos em raposas clarificaram a predilecção de *T. spiralis* para animais carnívoros em ambiente natural (Kapel *et al.*, 1995 e 1999) e experimental (Kapel *et al.*, 1994).

1.4 Interação parasita-hospedeiro

1.4.1 Resposta imune no hospedeiro

A resposta imune a nível intestinal é iniciada com penetração das larvas de *T. spiralis* nas células epiteliais colunares do intestino delgado provocando inflamação, com libertação de mediadores pró-inflamatórios como interleucinas (IL) beta 1, IL-8 e ENA-78, desde as primeiras cinco horas após a infecção, detectando-se ainda, interferão-gama (INF- γ) e citocinas do tipo 2 a partir dos nódulos linfáticos mesentéricos, as quais promovem uma resposta linfocitária Th₂. A produção de IL-3, IL-4 e IL-5 que regulam a inflamação e favorecem a infiltração de mastócitos, eosinófilos e o aumento da concentração da histamina e leucotrienos, causam danos na mucosa intestinal. Nos quinze dias posteriores à infecção, as contracções peristálticas promovem a expulsão do parasita. A resposta imunitária contra LNB deve-se à presença de anticorpos contra os antígenos de superfície, podendo estes anticorpos causar uma reacção citotóxica (Becky *et al* 1991).

A resposta imunitária que acompanha a triquinelose humana é caracterizada pelo aparecimento das imunoglobulinas das classes IgA, IgM e IgG (Ljungstrom, 1974; Boczon *et al.*, 1981; Van Knapen *et al.*, 1982; Au *et al.*, 1983 e Feldmeier *et al.*, 1987). Os anticorpos específicos da classe IgE e o aumento dos níveis de IgE total, parecem não aparecer obrigatoriamente em pacientes sofrendo de triquinelose.

Alguns estudos demonstraram que as subclasses de IgG dominantes na resposta imunitária a infecções parasitárias, são IgG₁ e IgG₄. Ljungstrom *et al* (1988), tendo por base um surto de *T. spiralis* ocorrido na Polónia, avaliaram a sequência no aparecimento das imunoglobulinas IgG, na infecção recente e um ano após infecção. Os resultados demonstraram que o aparecimento sequencial das IgG, iniciava-se com o isotipo da IgG₁ antes da IgG₃ e a IgG₃ antes da IgG₄., verificando, que os anticorpos IgG₁ dominavam a resposta imune em todos os pacientes. O aumento significativo da IgG₄ foi observado durante a fase crónica. No entanto, a correlação aparentemente

existente entre IgG₄ e IgE não foi encontrada, tendo sido detectado altos títulos de IgE nos soros obtidos na infecção recente e a sua diminuição com o decorrer da infecção.

Segundo alguns autores (Vitetta *et al.*, 1984; Vitetta *et al.*, 1985 e Sideras *et al.*, 1985), a interleucina 4 (IL-4) um principais factores de estimulação das células B será responsável pelo aumento da produção da IgG₁ e da IgE no rato (Coffman *et al.*, 1986). Em 1987, Paul & Ohara demonstraram *in vitro* que são necessárias altas concentrações de interleucina 4 (IL-4), de forma a estimular a produção da imunoglobulina IgE.

1.4.2 Antígenios e imunidade

Trichinella pode infectar diferentes tipos de hospedeiros, o que sugere que este género não é afectado pela imunidade do hospedeiro, sendo pouco imunogénico (Wakelin, 1996).

Bell (1998) resumiu a imunidade em três respostas básicas: consequência de rejeição da infecção larvar, rejeição das formas adultas e imunidade contra as larvas recém eclodidas (LNB). Algumas observações indicam que no caso do hospedeiro ser o porco, as larvas podem ser mortas antes do enquistamento, enquanto que no murganho a imunidade é mais expressa no intestino, sendo mediada primeiro por células T (Wakelin & Goyal, 1996) do tipo T-helper 2 (Th₂). As interações entre o hospedeiro e o parasita devem ser vistas em simultâneo nos dois, uma vez que as combinações genéticas são variáveis e por isso não são comparáveis (Wakelin & Goyal, 1996).

Os antígenios de *Trichinella* podem ser divididos em três grupos, com base na sua localização: os de superfície, os de Excreção/Secreção (ES) e os antígenios somáticos residuais (Dea-Ayuela *et al.*, 1999). Na larva muscular o material antigénico está localizado no esticosoma, hemolinfa, grânulos citoplasmáticos e glândula intestinal (Takahashi *et al.*, 1990). Após análise imunoquímica, verificou-se que os componentes cuticulares apresentam pouca imunogenicidade (Maizels *et al.*, 1982). Nos parasitas adultos os antígenios podem ser encontrados nos órgãos reprodutores (Takahashi *et al.* 1994).

Diferentes estados larvares apresentam diferentes antígenos. Segundo Ortega-Pierres *et al.*, (1996) esta característica poderá ser um dos mecanismos de evasão evitando que as defesas dos hospedeiros matem as larvas. Parecem existir dois grupos de antígenos de *Trichinella* que induzem a resposta imune em duas fases: a primeira nas duas semanas após infecção e até ao fim da fase intestinal mediada pelo antígeno fosforilcolina, e na segunda fase, 4 a 5 semanas após infecção (fase muscular), predomina o grupo de antígenos designado por grupo II ou antígeno TSL-1 (Appleton *et al.*, 1991). Estes antígenos (TSL-1) apresentam um peso molecular de 40 a 50 KD na electroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), possuindo num dos epítomos um carbohidrato composto por um açúcar designado por tivelose (Appleton & Romaris, 2001). Sabe-se que este açúcar está presente em algumas bactérias e em ovos de *Ascaris* e, após estudo experimental, concluiu-se que os anticorpos anti-tivelose não são protectores contra os parasitas adultos (Appleton & Romaris, 2001). As larvas LNB têm antígenos com pesos moleculares de 20, 30 58 e 64 KD, enquanto que as larvas musculares apresentam fracções de 47, 55, 90 e 105 KD (Dea-Ayuela *et al.*, 1999).

A maior fonte de antígenos ES é o esticossoma, composto por esticócitos. Estudos mais recentes indicam que a glicoproteína de 43KD pode ser usada no diagnóstico da triquinelose pela técnica de “Western blot” (Yera *et al.*, 2003).

Os antígenos somáticos são mais conservados, mas menos específicos que outros antígenos. Para o despiste de reacções cruzadas, os antígenos somáticos podem ser muito úteis especialmente na detecção de estadios iniciais de infecção, podendo ainda ser importantes no diagnóstico após morte do parasita (Dea-Ayuela *et al.*, 1999). Boireau *et al.*, (1997), realizaram um estudo onde foram seleccionados anticorpos monoclonais que permitiram identificar determinantes antígenicos comuns das seguintes espécies: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. pseudospiralis* e *Trichinella* T5. Assim, usando o método de imunofluorescência dos 40 anticorpos monoclonais usados, 23 destes apresentaram reacções cruzadas com as cinco estirpes de *Trichinella*.

Após a infecção primária, é desenvolvida uma imunidade protectora. A rápida expulsão de formas infectantes a partir do intestino na infecção secundária está bem definida nos ratos, sendo considerada uma reacção mediada por anticorpos da classe IgE (Negrão-Correa, 2001). Contudo, os mastócitos não parecem estar envolvidos na reacção (Watanabe *et al.*, 2005). O envolvimento da IgA na expulsão intestinal foi também descrita em murganhos (Inaba *et al.*, 2003). Noutro tipo de infecções, como por exemplo, no porco, a fecundidade das fêmeas estava diminuída em 51% e os adultos eram expelidos do intestino em três semanas (Marti & Murrell, 1986). Por outro lado, em ratos a mudança de imunidade estará directamente dependente de estadios de pré adulto, uma vez que a expulsão ocorrera em horas (Wakelin & Denham, 1983). Appleton *et al.*, (1988) verificaram que a imunização passiva com anticorpos anti-tivelose em ratos neonatais induzia rapidamente a expulsão completa das larvas de *Trichinella*. Alguns estudos demonstraram que a imunidade parcial na triquinelose podia também ser produzida pela vacinação. Com efeito Goyal *et al* (2002) verificaram que a vacinação com antígenos TSL-1 estimulava reacções protectoras, sendo um destes antígenos, de peso molecular 43 KD, especialmente potente. De acordo com os resultados de Silberstein & Despommier (1984), a imunização de murganhos com 10 µg de proteína 48KD reduziu o nascimento larvar em 81% em comparação com o controlo. A vacinação contra *Trichinella spiralis* através de administração intra nasal de homogeneizado larvar ou de um péptido antigénico, na presença da subunidade b de *Vibrio cholerae* como adjuvante, também resultou numa redução significativa de adultos no oitavo dia após infecção (McGuire *et al.*, 2002). A imunização de murganhos com uma preparação da vacina de DNA (Cui *et al.*, 2004), demonstrou que a activação da resposta humoral e celular reduziam o aparecimento de larvas nos músculos (Wang *et al.*, 2005).

1.5 Infectividade e resistência

Trichinella spiralis não afecta animais de sangue frio, a não ser que a temperatura deles seja elevada a 37°C. Todos os animais homeotérmicos são susceptíveis, se bem que em condições naturais a infecção só ocorra em animais de hábitos carnívoros ou omnívoros. A resistência aumenta com a idade, mas é reduzida pelas carências nutricionais, especialmente vitamina A (Pozio, 2005).

Os animais parasitados que recuperam de uma infecção mostram-se mais resistentes a uma segunda carga parasitária, porém, no homem, essa protecção não é marcante. A administração de antigénios extraídos de larvas ou de parasitas adultos produz imunização em animais de laboratório, sendo a imunidade manifestada pelo escasso desenvolvimento das fêmeas e redução da fecundidade e, em consequência, originando um pequeno número de larvas na musculatura do hospedeiro.

A imunidade passiva pode ser provocada em animais de laboratório injectados com soro imune potente, o mesmo ocorrendo com crias de fêmeas infectadas que podem receber anticorpos através do leite.

O mecanismo de imunidade em *T. spiralis* parece ser extremamente complexo. Já foram isolados vários antigénios de natureza diversa (Boireau *et al.*, 1997), verificando-se que os que se isolam nas larvas diferem dos encontrados nos parasitas adultos. A imunidade intestinal é, em grande parte, de natureza humoral e deve impedir o desenvolvimento das larvas ingeridas, bem como a fixação dos adultos. Do ponto de vista prático, este aspecto é muito importante porque reduz a produção de larvas e a consequente invasão da musculatura. É possível que outros mecanismos envolvendo o aumento da produção de muco e o peristaltismo intestinal concorram para a expulsão das formas infectantes.

1.6 Resistência ao congelamento

Mesmo antes das diferentes espécies de *Trichinella* serem caracterizadas, observou-se que as larvas musculares encontradas em animais do ártico sobreviviam ao congelamento enquanto que as de regiões temperadas morriam (Dick & Belosevic, 1978 e Kjos-Hanssen, 1984). *T. nativa* tolera melhor o congelamento que *T. spiralis*, especialmente nos músculos dos hospedeiros, mas a sua resistência é reduzida em murganhos (Pozio *et al.*, 1992b). A infectividade de *T. nativa* foi encontrada em músculos de raposa após 4 anos de armazenamento a uma temperatura inferior a 18°C (Kapel *et al.*, 1999). No músculo do rato, a infectividade mantêm-se após quatro semanas guardado à mesma temperatura, enquanto que o índice de capacidade de reprodutibilidade é baixo após uma semana de congelamento (Malakauskas *et al.*, 2001). Assim, *T. spiralis* pode tolerar temperaturas inferiores a 18°C no porco por 5 dias (<http://www.med.unipi.it/ict/>) e, no presunto, pode permanecer viável por quatro semanas (Theodoropoulos *et al.*, 2000). Nos músculos dos ratos, *T. spiralis* não tem infectividade após uma semana de armazenamento à mesma temperatura (Malakaukas *et al.*, 2001). Alguns estudos indicam que a idade da larva também influencia a resistência ao frio. Efectivamente, segundo Pozio *et al.*, (1993) as larvas musculares com um ano sobrevivem melhor do que larvas de dois meses. Em azoto líquido as larvas musculares sobrevivem, mas a sua infectividade diminui (Jacson-Gegan & James, 1998). A criopreservação de *Trichinella* pode reduzir a necessidade da manutenção do ciclo em animais de laboratório, contudo um pré-requisito deste método, é que a larva se mantenha infectante durante o congelamento. Segundo o Centro de Referência de *Trichinella* (<http://www.iss.it/site/Trichinella/index.asp>), 18% das espécies isoladas em porcos domésticos na Europa são identificadas como *T. britovi*. A sua tolerância à congelação é influenciada pela idade da infecção e pelas condições de congelação e descongelação (Quadro I).

Origem da carne	Idade da larva	Temperatura °C	Semana/s de congelação	Infectividade da larva após a descongelação
Javalis infectados naturalmente	desconhecida	-20	3	sim
Javalis infectados naturalmente	desconhecida	-20	4	não
Porcos infectados experimentalmente	5 - 10 semanas	-18	1 - 4	não
Porcos infectados experimentalmente	5 - 10 semanas	-5	1 - 4	sim
Javalis infectados experimentalmente	5 - 10 semanas	-18	1 - 4	não
Javalis infectados experimentalmente	5 - 10 semanas	-5	1 - 4	sim
Porcos infectados naturalmente	desconhecida	-18	1	não
Javalis infectados naturalmente	desconhecida	-35	1	sim

Quadro 1 – Variabilidade na sobrevivência de *T. britovi* na carne congelada de porco e javali

(adaptado www.eurosurveillance.org)

1.7 Epidemiologia

As espécies de *Trichinella* encontram-se em áreas geográficas muito amplas que vão desde o ártico até aos trópicos, contudo a sua distribuição depende da espécie, sendo mais restrita nas espécies cujas larvas enquistam que geralmente demonstram uma maior adaptação a climas frios do que as que não enquistam (Figuras 8-11).

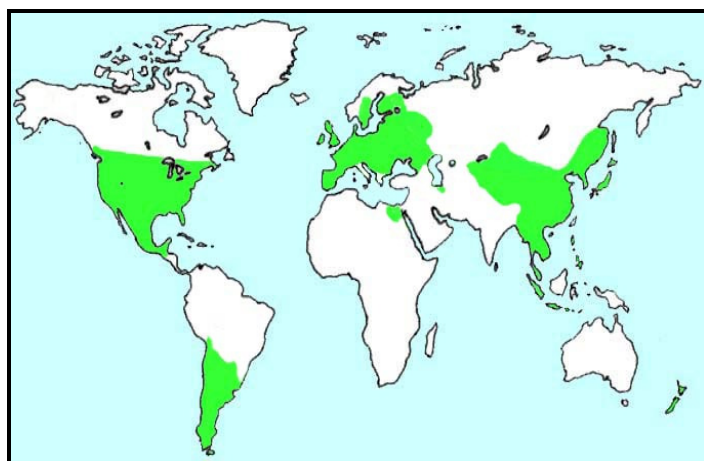


Figura 8 – Distribuição mundial da *Trichinella spiralis*
(Adaptado: <http://www.k-state.edu>)

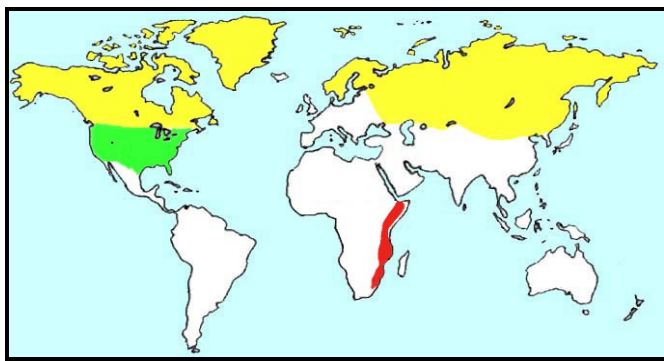


Figura 9 – Distribuição mundial *Trichinella nativa* (T-2: amarelo), *Trichinella nelsoni* (T-7: vermelho), *Trichinella murrelli* (T-5: verde)

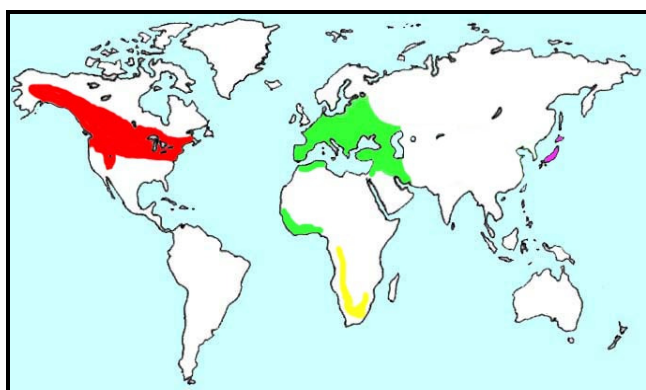


Figura 10 – *Trichinella* designada como T-6 (vermelho), é similar a *T. nativa*. *Trichinella britovi* T-3 (verde) incluindo T-9 (roxo) e T-8 (amarelo), actualmente a T-9 do Japão é mais similar to *T. murrelli* que com a *T. britovi*

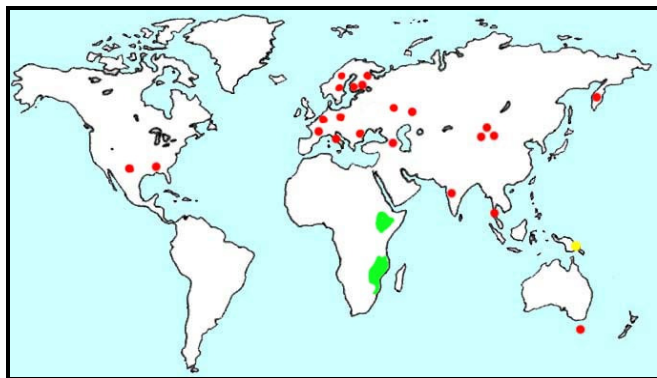


Figura 11 – Existem três espécies não-encapsuladas de *Trichinella*.

- *Trichinella pseudospiralis* (T-4) (pontos vermelhos).
- *Trichinella papuae* (T-10) (amarelo)
- *Trichinella zimbabwensis* (verde)

O maior grupo de hospedeiros de *Trichinella* spp. são os javalis (*Sus scrofa*) e os porcos domésticos, e ainda, os animais sinantrópicos como os ratos, gatos, cães, armadilhos e outros carnívoros silváticos, sendo possível importar infecção de outros países devido à infectividade do porco e dos ratos sinantrópicos (Pozio, 2001). *T. spiralis* mostra uma distribuição cosmopolita em

zonas temperadas e equatoriais. Algumas revisões bibliográficas sumarizam a presença de triquinelose em certos países individualmente tais como: a Argentina (Ribicich *et al.*, 2005), Hungria (Sreter *et al.*, 2005), China (Liu & Boireau, 2002), México (Flisser *et al.*, 2002 e Gutierrez-Cogco *et al.*, 2002) e Grécia (Sotiraki *et al.*, 2001). As alterações políticas e económicas a sudoeste da Europa levaram ao ressurgimento da triquinelose tendo sido reportados casos em algumas regiões destes países (Cuperlovic *et al.*, 2005). Além disso, foram ainda referidos surtos epidémicos recentes na Alemanha, Itália e Reino Unido (Pozio & Marucci, 2003).

A triquinelose é uma das zoonoses helmintícas que apresenta uma vasta distribuição, sendo endémica em alguns dos países europeus. O avanço biotecnológico tem sido usado para reavaliar a taxonomia, epidemiologia e os ciclos de vida dos agentes etiológicos, permitindo informação adicional sobre factores que contribuem para a manutenção destes parasitas na natureza. O velho conceito de que os porcos e ratos são os principais hospedeiros de *Trichinella spiralis*, frequentemente referido em muitos livros, foi reavaliado por Pozio (1998). Segundo este autor, na União Europeia (UE) encontram-se identificadas três espécies de *Trichinella*: *T. spiralis* agente etiológico da triquinelose doméstica, podendo também ocorrer em animais silváticos; *Trichinella brivoti*, considerado o agente etiológico silvático mais frequente na UE e *Trichinella nativa* responsável pelo ciclo silvático na Finlândia e em algumas áreas do norte e do centro da Suíça. A transmissão destas espécies, em determinados países, caracteriza-se por ocorrer:

(1) apenas em ciclo silvático - *Trichinella brivoti* e *T. nativa*;

(2) normalmente apenas no ciclo silvático, mas podendo aparecer no ciclo doméstico - *Trichinella spiralis*,

(3) pode ocorrer simultaneamente nos ciclos silvático e doméstico - *Trichinella spiralis*;

A natureza da triquinelose em algumas regiões da UE não está ainda bem caracterizada, devido ao grande leque de factores a serem analisados, como a isolamento e identificação de parasitas provenientes dos ciclos doméstico e silvático. No entanto, existem outros países e regiões consideradas livres de *Trichinella* spp. (Figura 12)

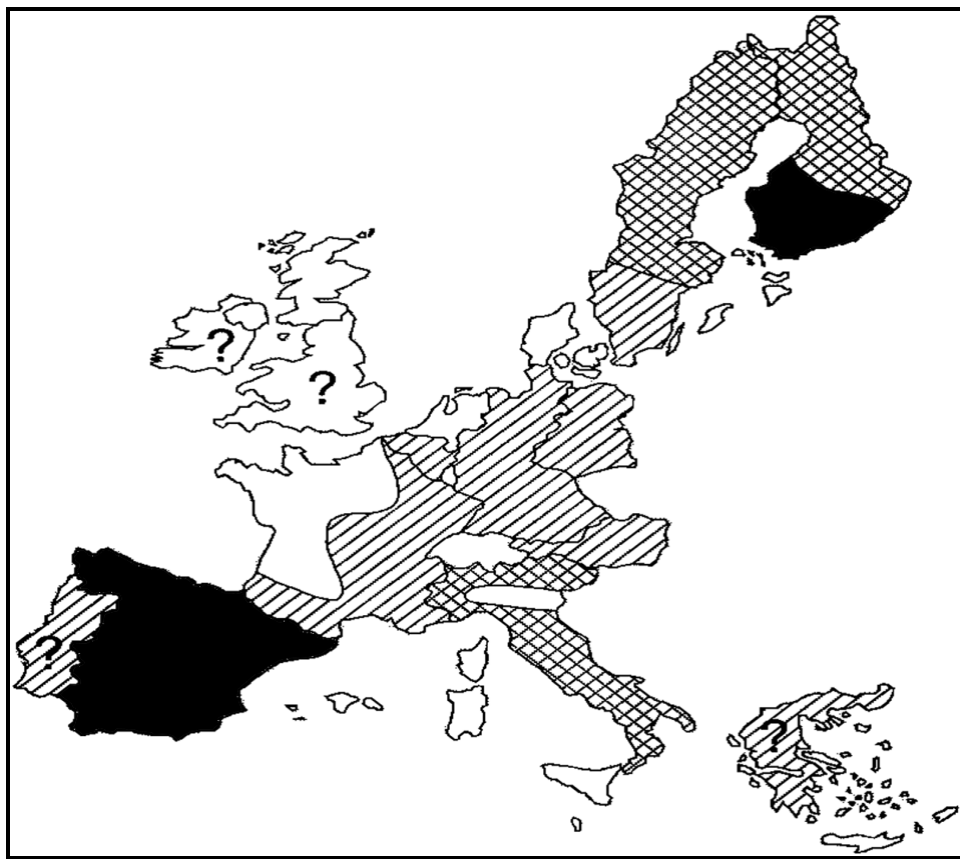


Figura 12 – Distribuição da triquinose em países da UE, as áreas brancas mostram regiões livres de triquinose. As regiões pretas mostram zonas onde o ciclo silvático e doméstico ocorrem simultaneamente. As zonas riscadas mostram zonas ciclo silvático, os pontos de interrogação indicam a necessidade de estudos epidemiológicos. (Pozio, 1998).

1.7.1 Triquinose em habitat silvático

Geralmente a triquinose silvática afecta carnívoros com comportamento de canibalismo e predacção. Na maioria das regiões da UE o reservatório específico é a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), enquanto que na Finlândia, o guaxini (*Nyctereutes procyonoides*) é o principal reservatório. Outros carnívoros (urso, lince e lobos) também podem ser infectados, tendo, no entanto, um papel secundário na ecologia silvática devido a serem em número reduzido.

Investigações recentes sugerem que *T. britovi* e *T. nativa* sobrevivem apenas em alguns carnívoros silváticos que vivem em ecossistema natural. Este quadro epidemiológico é suportado pela presença de carnívoros selvagens onde o ecossistema não foi alterado por acção humana

(aéreas montanhosas e parques naturais). O factor chave responsável pela distribuição limitada destas espécies é o comportamento alimentar destes hospedeiros. O canibalismo ocorre frequentemente em áreas remotas, pois quando vivem próximo de habitat humano, os hospedeiros silváticos podem comer o lixo e ou comida dos animais domésticos. Este comportamento alimentar pode explicar a evolução favorável à sobrevivência a longo prazo das larvas de *Trichinella* no músculo a baixas temperaturas. Actualmente, nas regiões centrais e a sul da UE, o ciclo silvático da triquinelose tem uma maior prevalência em raposas que vivem a altitudes superiores a 400-500 m acima do nível do mar ou em regiões protegidas, onde o ambiente é menos perturbado. Em áreas de altitude mais baixa, a possibilidade de encontrar *Trichinella* é muito reduzida devido ao grande impacto humano no ambiente. No entanto, o clima montanhoso é caracterizado por uma alta humidade e baixas temperaturas comparado com climas de baixa altitude, o que favorece a sobrevivência da larva muscular nos hospedeiros por um longo período de tempo. A triquinelose silvática é mais acentuada em países nórdicos (Finlândia) e nas regiões centrais e a sul da Europa, devido ao impacto humano no ecossistema natural.

1.7.2 As relações entre a triquinelose e as características do habitat.

As regiões ao nível do mar com altitude abaixo de 400-500 m são consideradas livres de *Trichinella*. A prevalência da infecção em raposas vermelhas aumenta com a altitude. Os javalis e os porcos que se alimentam em zonas selvagens podem adquirir infecções com parasitas, mas nestas relações apenas o ciclo silvático (Pozio, 1998) está presente, embora se admita que nestas áreas o ciclo doméstico tenha existido anteriormente (por exemplo, Áustria, Bélgica, França, Alemanha e sul da Suécia e provavelmente, também na Grécia e Portugal).

Em Espanha a raposa é o reservatório principal da *T. spiralis*, *T. brivoti* e *T. nativa*, enquanto que os porcos domésticos e os javalis são o reservatório principal da *T. spiralis*. A Figura 13 mostra a ecologia na região espanhola da Estremadura.

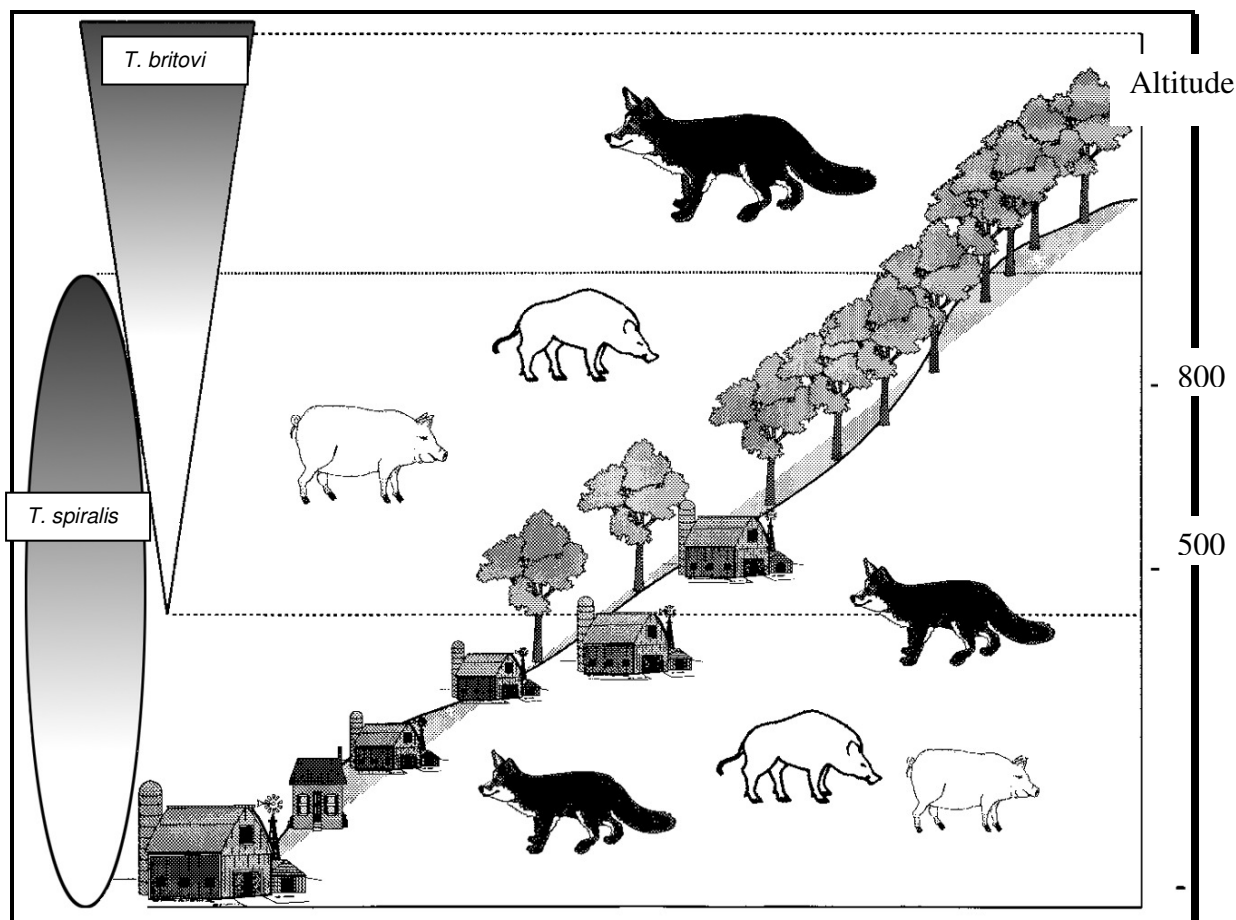


Figura 13 – A ecologia da triquinose na região espanhola da Estremadura. A raposa é o principal reservatório da *T. brivoti*, sendo os javalis e os porcos domésticos o reservatório da *T. spiralis*. (Adaptado de Pozio, 1998.)

Na Áustria, Bélgica e a sudoeste da França, Alemanha e a sul da Suécia, o ciclo doméstico é o mais antigo, apesar dos carnívoros silváticos poderem também albergar *T. spiralis* assim como *T. brivoti*. Em França, as raposas albergam maioritariamente *T. spiralis* mas quando se encontram a baixa altitude apresentam também *T. brivoti*, sugerindo que estas infecções poderão ter tido origem doméstica. Na Itália apenas existe o ciclo silvático, o que parece ser devido ao comportamento humano e à barreira geográfica dos Alpes. Com efeito, admite-se que estes factores tenham

contribuído para impedir o estabelecimento da *T. spiralis* no ciclo doméstico e para a transmissão desta infecção para os animais silváticos.

O habitat doméstico não representa um bom ambiente para *T. brivoti* e *T. nativa*, pois a sua capacidade reprodutiva nos porcos e nos roedores é muito baixa (Pozio *et al.*; 1996). Estas alterações biológicas resultam na restrição severa da transmissão a partir de animais selvagens para hospedeiros associados ao ambiente humano (ex. porcos domésticos e ratos). Existem poucos casos relatados sobre a ocorrência de *T. brivoti* e *T. nativa* em animais domésticos. Contudo, *T. brivoti* e *T. nativa* podem invadir o habitat doméstico assim como *T. spiralis*, quando os humanos misturam a vida selvagem com os animais domésticos, como por exemplo, através do pastoreio de animais domésticos (porcos e cavalos) em áreas remotas, ou ao alimentarem animais domésticos com a carne de animais selvagens infectados ou, ainda, através do consumo de carne de veado ou outros animais selvagens sem controlo sanitário para *Trichinella*. Felizmente que os animais domésticos infectados com espécies selvagens de *Trichinella* representam o fim do ciclo silvático, pois normalmente a grande maioria destes parasitas encontra-se quase exclusivamente em animais silváticos.

1.7.3 Triquinelose em habitat doméstico

Existe um consenso em que os porcos domésticos e os ratos representam a maioria das infecções por *Trichinella* no habitat doméstico. O ciclo ocorre exclusivamente em áreas rurais de algumas regiões de Espanha e sudeste da Finlândia, onde prevalece a prática tradicional de criação de porcos. A introdução do ciclo doméstico numa dada região pode também estar associada a infecções de populações de javalis, mas nestas circunstâncias o estabelecimento do ciclo doméstico parece ser remoto, uma vez que a prevalência da infecção nos javalis é maior em regiões onde a triquinelose doméstica tenha existido previamente. Por exemplo, na região espanhola da

Estremadura onde a triquinelose doméstica é endémica, a sua prevalência é de 0,48%, (Pozio *et al.*; 1996), o que é similar ao que acontece no sul da Finlândia onde a prevalência é de 1,3% (Kim, 1983). Em contraste, em França, as infecções em javalis situam-se entre 0,002 e 0,003% (Pozio *et al.*; 1996). A base deste modelo epidemiológico será provavelmente a combinação da tradicional criação de porcos e as poucas condições sanitárias, resultando em infecções de *Trichinella spp.* em porcos em áreas onde os javalis podem ter facilmente acesso.

1.7.4 Áreas da UE livres de Triquinelose

Os sistemas de vigilância confirmam a ausência de triquinelose doméstica na Dinamarca e nos Países Baixos. Em alguns países, as inspecções indicam apenas uma baixa ocorrência de triquinelose silvática. Nas ilhas Britânicas não existe qualquer registo de parasitas em animais domésticos ou casos de infecção humana desde 1969 (Kim, 1983). Contudo, a hipótese destes países estarem livres de *Trichinella* tem de ser confirmada através de uma vigilância epidemiológica. Existem ainda vastas regiões noutros países que não apresentam nenhum dos ciclos, silvático e ou doméstico. Por exemplo, existem dados que consideram o nordeste das regiões da França, Vale do Pó e outras planícies em Itália e ilhas do mar Mediterrâneo (Córsega, Sicília e Sardenha), livres da transmissão de *Trichinella spp.*

1.7.5 Triquinelose humana na Europa

Segundo Pozio (1998), o parasitismo por *Trichinella* identificado em humanos reflectem a situação epidemiológica da UE. Os casos referidos serão resultantes de algumas práticas alimentares bem como do aumento de animais importados de áreas endémicas. No passado, em França e em Itália, houve um número elevado de infecções devido ao consumo de carne de cavalo. Todos os cavalos infectados tiveram como origem zonas não integradas na UE (países a sudoeste da

Europa e América do Norte). As infecções devido ao consumo de carne de porco são raras, excepto em Espanha. Investigações epidemiológicas indicam que a fonte da infecção no porco é sempre o porco doméstico, criado em clausura ou em pequenas quintas (mais de 1000 casos nos últimos 10 anos). Fontes alternativas de infecção resultam da exposição do porco doméstico a hospedeiros silváticos em áreas selvagens (12 casos na Áustria em 1970, 21 casos em França em 1983, cerca de 500 casos na Alemanha desde de 1970, tendo havido um epidemia em 1982, ocorrendo 400 casos).

O aumento da população de javalis na Europa causou o aumento de infecções humanas devido ao consumo desta carne em França, Alemanha, Itália e Espanha (1200 casos desde 1970). Outras fontes de infecção na UE, embora mais raras, resultaram do consumo de carne de raposa ou foram adquiridas fora da UE. Em 1998, Pozio refere que a triquinelose humana deve-se principalmente, ao consumo de animais locais (domésticos ou silváticos), tendo sido assinalados casos na Áustria, Bélgica, Dinamarca, Finlândia, Grã-bretanha, Irlanda, Luxemburgo, Portugal, Suécia e Países Baixos.

Em Espanha ocorrem cerca de 50 a 100 casos por ano de triquinelose humana causada por *T. spiralis* e *T. brivoti*, devido ao consumo de carne de porco doméstico e produtos derivados deste. Em 1998 e 1999, a carne de porco importada da Alemanha causou um surto de 52 casos. (Pozio et al., 1996) e, desde 1990 a 2001, ocorreram sete casos a partir do consumo de porco. Nos anos 1995 a 1998, um total de 192 casos foram associadas ao consumo de javali (Rodriguez-Osorio *et al.*, 1999 e Rodriguez de las Parras *et al.*, 2004).

1.7.6 Triquinelose em Portugal

Segundo Pozio (2007), o ciclo silvático da *T. brivoti* está presente na raposa vermelha e em lobos, tendo sido detectada a infecção num porco de criação doméstica em Montalegre em 1966. Em relação à triquinelose humana apenas existem duas referências (cinco pessoas em 1962 e uma pessoa em 1967), causadas pelo consumo de carne de porco (Vieira, 1983). Em canídeos selvagens, Azevedo *et al* (1974) observaram um caso de infecção por *T. spiralis* através do exame histológico

de um fragmento de diafragma de lobo. Em 1975, Azevedo *et al.*, realizaram um pequeno rastreio sobre triquinelose e leptospirose mas o estudo não foi conclusivo. Recentemente, foram feitos estudos no nosso país sobre *Trichinella* spp., um sobre a helmintofauna de ungulados silvestres no perímetro florestal da Contenda, por Sousa *et al.*, (2003) em que foram pesquisadas larvas L1 deste parasita em 24 javalis, tendo os resultados sido negativos; outro estudo nesse mesmo ano, realizado por Grácio *et al.*, visou a investigação de triquinelose em javalis. Dos 31 animais capturados em zonas da Beira Litoral e Interior, foram detectadas larvas de *Trichinella* spp no diafragma de um javali. Um outro estudo, tendo como tema “Triquinelose silvática em Portugal continental” realizado por Magalhães *et al.*, (2004), detectaram-se diversos animais (raposas, lobos e lontra) positivos para *Trichinella* spp. e, em sete amostras foi identificada a espécie *T. brivoti*.

1.7.7 Ausência de Triquinelose no mundo

Segundo Pozio (2007), infecções por *Trichinella* nunca foram documentadas nas ilhas dos vários continentes, podendo concluir-se que estes parasitas não estarão presentes, sendo só passíveis de introdução através de humanos:

- África (Cabo Verde, Comores, Madagáscar, Maurícias, São Tomé e Príncipe e Seychelles).
- América (Ilhas do Caribe Antigua-Barbuda, Bahamas, Barbados, República Dominicana, Granada, Haiti, Jamaica, Puerto Rico, St Lúcia, Trinidad-Tobago)
- Ásia (Este de Timor, Maldivas, Filipinas, Singapura, Sri Lanka e Taiwan).
- Europa (Chipre, Islândia e Malta)
- Pacífico (Fiji, Kiribati, ilhas Marshall, Palau, Nauru, Samoa, Ilhas Salomão, Tonga, Tuvalu e Vanuatu).

1.8 Triquinelose: sintomas

Os sintomas só surgem se as larvas enquistadas forem em número superior a algumas dezenas. Contudo, é possível ingerir numa só refeição de carne “mal passada” em número suficiente de larvas. Durante a fase de desenvolvimento das larvas no intestino até à fase adulta e acasalamento dos vermes adultos, os sintomas podem manifestar-se por náuseas, vômitos, diarreia e febre. Depois de mais alguns dias, quando as larvas recém eclodidas começam a circular no sangue, surge a dor muscular durante a contração, com dificuldades motoras, febre, edemas e exantemas cutâneos com prurido. Outras complicações possíveis, apesar de pouco frequentes, podem surgir como a meningoencefalite e a miocardite devido à migração accidental das larvas para estes órgãos (Figura 14). A mortalidade é muito baixa e os sintomas podem desaparecer com o enquistamento e quiescência das larvas, em menos de dois meses.

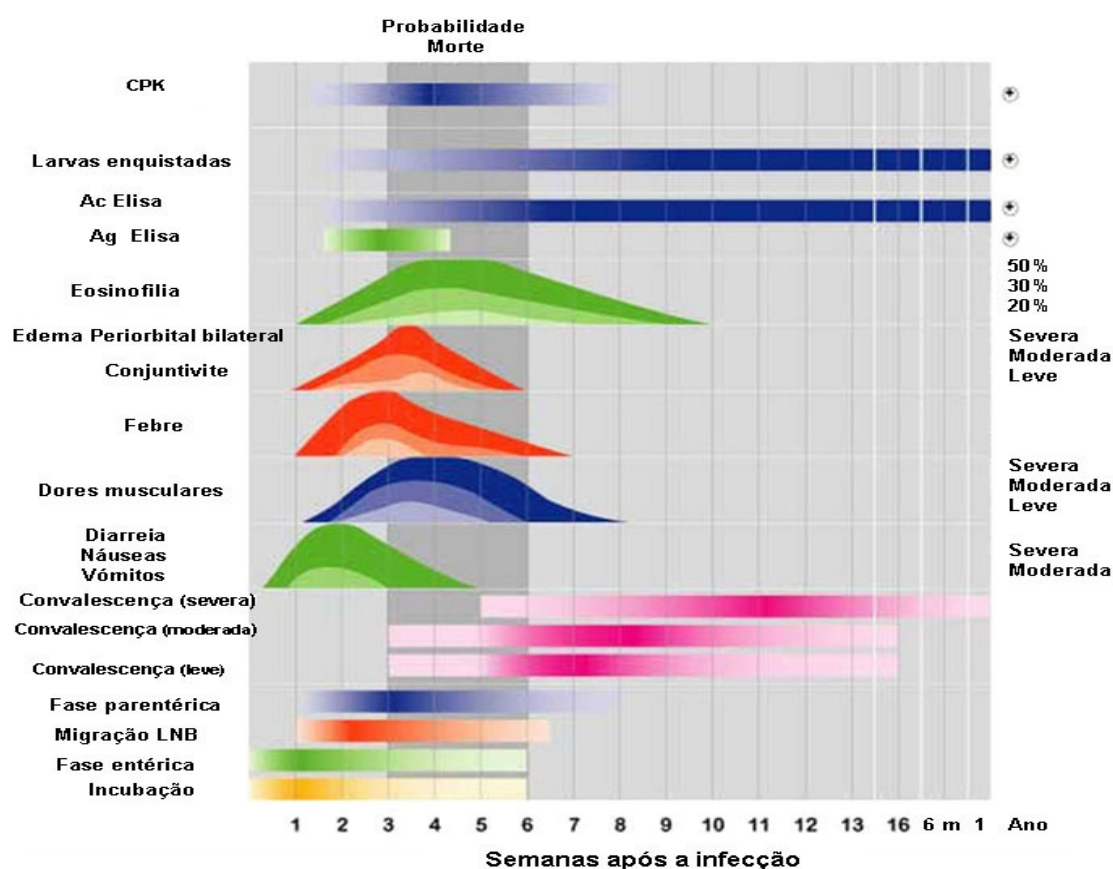


Figura 14 – Sumário de sinais e sintomas, resultados laboratoriais e testes de diagnóstico em pacientes com triquinelose moderada (cor clara) a severa (cor mais intensa).

(Adaptado: <http://www.wormbook.org>.)

1.9 Triquinelose: diagnóstico

O uso de testes serológicos para detectar infecções por *Trichinella* em animais selvagens e domésticos não está ainda padronizado. A Comissão Internacional para a Triquinelose (Gamble *et al.*, 2000) recomenda a aplicação de alguns testes serológicos para a detecção da infecção por *Trichinella* em animais e no homem.

Assim, o programa de inspecção para *Trichinella* no porco, cavalo e veado realiza-se através do método de exame directo utilizando o triquinoscópio, que envolve a compressão de pedaços de músculo entre duas placas de vidro e a sua observação microscópica. No entanto, o método mais utilizado actualmente é a digestão péptica do tecido muscular (Gamble *et al.*, 2000; Nocler *et al.*, 2000 e European Commission, 2001). Este método é também usado em investigação de forma a isolar as larvas musculares. A digestão do músculo é tratada com um “fluido estomacal” artificial consistindo em ácido clorídrico e pepsina, de forma a libertar as larvas das suas cápsulas. As larvas sedimentam no fundo do tubo após centrifugação, podendo proceder-se à sua contagem após visualização do sedimento ao microscópico. Devido à baixa prevalência de larvas na inspecção da carne, é normalmente analisado um “pool” de amostras.

A legislação para a inspecção sanitária da carne e dos seus produtos derivados, para a presença de *Trichinella*, inclui apenas testes directos, devendo estes apresentar uma sensibilidade e especificidade que permitam detectar pelo menos uma larva por grama de carne, considerado o grau de preocupação mínimo a nível de saúde pública (Geerts *et al.*, 2002).

Embora os métodos serológicos para detecção da parasitose por *Trichinella* não sejam considerados adequados para inspecção da carne, estes podem ser importantes em estudos de vigilância da infecção e investigação epidemiológica em populações de animais, em particular em regiões onde a sua prevalência é alta, bem como no diagnóstico presuntivo ou retrospectivo e, ainda, na vigilância da infecção em humanos.

1.9.1 Diagnóstico serológico em animais

Os testes serológicos que podem ser aplicados em animais são: imunofluorescência indirecta (IF) podendo usar-se músculo infectado de roedor criopreservado, larvas congeladas ou fixadas em formalina; “Western-blot” usando antígenos de excreção/secreção, técnicas imuno-histoquímicas; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) usando produtos da excreção/secreção das larvas musculares (Gamble *et al.*, 1988) ou antígeno sintético de tivelose (Gamble *et al.*, 1997; Kapel & Gamble, 2000; Pozio *et al.*, 2002b). Os problemas na serologia da *Trichinella* resultam das reacções cruzadas com outros parasitas (Abdel-Rahman *et al.*, 2003; Yera *et al.*, 2003 e Abdel-Rahman & Abdel-Megeed, 2005). Os animais estão muitas vezes expostos a outros nemátodes, podendo afectar os resultados se o teste não for específico e sensível. O extracto larvar não deve ser usado em testes devido à ocorrência de reacções cruzadas, e à falta de padronização dos antígenos e métodos imunológicos, pelo que a sua utilização na serologia não é recomendada na inspecção sanitária (Gamble *et al.*, 2004).

1.9.2 Diagnóstico serológico em humanos

Os métodos serológicos são os mais aplicados, uma vez que o facto de retirar uma biópsia muscular representativa é desconfortável para o doente. A serologia no diagnóstico humano pode ser bastante fiável quando combinada com outros parâmetros, sendo necessários pelo menos dois testes laboratoriais para confirmação do diagnóstico (Bruschi & Murrell, 2002). Para além das amostras de sangue, o fluido muscular também pode ser usado no diagnóstico (Haralabidis *et al.*, 1989; Beck *et al.*, 2005 e Moller *et al.*, 2005).

Os métodos mais usados no diagnóstico de infecção por *Trichinella spp.* são: a hemaglutinação indirecta, floculação, IF, aglutinação em látex e ELISA, sendo este último o que apresenta uma maior sensibilidade (Bruschi & Murrell, 2002 e Dupoy-Camet *et al.*, 2002). Técnicas de inibição competitiva e “Western-blot” (Dupoy-Camet *et al.*, 1988 e Pozio *et al.*, 2002b;) podem

também ser usadas, sendo normalmente considerados testes confirmatórios. Reacções cruzadas com anticorpos foram encontradas em doentes com certas doenças auto-imunes (Robert *et al.*, 1996) e quando apresentavam outras parasitoses (Yera *et al.*, 2003).

A técnica de ELISA é o método normalmente mais usado na detecção de infecção por *Trichinella* tanto em animais como em humanos, devido à economia, rapidez de execução, sensibilidade e especificidade, sendo recomendado pelo Office International des Epizooties (OIE, 2000) como o único método serológico a ser utilizado no “screening” da infecção no porco doméstico.

A técnica de ELISA pode também ser aplicada para avaliar a produção de anticorpos do hospedeiro ou antígeno de *Trichinella* na amostra. Quando possível, deverão ser analisadas duas amostras de soro com duas semanas de intervalo para demonstrar se há aumento do título de anticorpos. A aplicação de ELISA tem sido usado para a detecção de anticorpos contra antígenos de *Trichinella* (Kapel *et al.*, 1998b e Sukura *et al.*, 2001), nomeadamente antígeno de excreção-secreção (Murrell *et al.*, 1986; Van der Leek *et al.*, 1992 e Kapel *et al.*, 1998b) e antígenos sintéticos de tivelose (Pozio *et al.*, 2002b e Forbes *et al.*, 2004). Anticorpos poli e monoclonais podem ser utilizados para demonstrar a presença de antígenos circulantes de *Trichinella* (Li & Ko, 2001). A mais recente aplicação de ELISA em *Trichinella*, é o método de dipstick, que consiste em papel de nitocelulose cortado em tiras e impregnados com antígeno ou anticorpo específico (Al-Sherbiny *et al.*, 2004). Os resultados preliminares sugerem que este teste é mais rápido e simples do que a ELISA convencional.

A técnica de “Western blot” pode ser aplicada na detecção de anticorpos ou de antígeno em soro. Nesta técnica os antígenos são reconhecidos pelo seu peso molecular. Com a produção industrial de tiras de “Western blot” parece não ocorrer reacções cruzadas, o que será uma importante mais valia para o diagnóstico da triquinelose (Yera *et al.*, 2003). Contudo existem diferenças entre o perfil de bandas observadas em “Western blot” de animais e de humanos infectados com a mesma espécie de *Trichinella* (Dupoy-Camet *et al.*, 1988).

1.10 Diferenciação de espécies de *Trichinella* por métodos moleculares

As espécies de *Trichinella* foram definidas biologicamente através de experiências cruzadas (Pozio & La Rosa, 2000), identificando-se, assim, a existência de oito espécies. A identificação requer o isolamento da larva a partir de amostras musculares, pelo que as amostras foram inicialmente separadas por métodos isoenzimáticos, mas actualmente a caracterização realiza-se por PCR (Polimerase Chain Reaction). Vários *primers* foram usados na identificação de *Trichinella* por PCR, primeiro pelo método RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polimerase Chain Reaction) (Bandi *et al.*, 1993 e 1995), e mais tarde por Multiplex-PCR (Zarlenga *et al.*, 1999 e 2001). Segundo estes autores, a utilização de cinco *primers* numa única reacção, neste método, permite identificar sete genótipos através do conhecimento do peso molecular de uma banda ou de várias bandas dependendo da sua especificidade para a espécie ou para o genótipo.

2-JUSTIFICAÇÃO E OBJECTIVOS

2. Justificação e objectivos

A triquinelose é uma doença que pode afectar os indivíduos de forma aguda ou crónica (Kociecka, 2000), com a possibilidade de manifestar um quadro clínico debilitante ou, até mesmo, fatal, com efeitos psicológicos e físicos.

Revisões epidemiológicas da triquinelose em várias regiões do mundo sugerem que existem surtos em áreas a Sudoeste da Ásia, na América Central e do Sul, onde as práticas agrícolas e as regulações sanitárias para a produção alimentar não estão ainda optimizadas (Takahashi *et al.*, 2000 e Ortega-Pierres *et al.*, 2000). Na América do Norte, a maioria das ocorrências de triquinelose foi atribuída ao consumo de carne de animais selvagens infectados, essencialmente, por *T. nativa*, *T. murrelli* e *Trichinella T6*.

Na Europa, nos últimos 25 anos, o aumento dramático da ocorrência de casos de triquinelose deve-se sobretudo, ao aumento do consumo de carne de cavalo nas zonas a oeste da Europa (Boireau *et al.*, 2000) e à transmissão de *Trichinella* spp. através do porco, em áreas endémicas a este da Europa (Dupoy-Camet, 2000). Por várias razões, a triquinelose é vista como uma doença alimentar emergente ou re-emergente em algumas partes do mundo. Por exemplo, a transmissão eficiente de espécies de *Trichinella* resistentes ao frio nas regiões do Ártico (Forbes, 2000) e o papel dos mamíferos desta região na dieta das populações tem resultado num aumento da prevalência ou, até mesmo, na sua introdução como patologia nalgumas áreas.

Diversas regulamentações europeias, internacionais, e outras orientações foram desenvolvidas para proteger os consumidores contra a exposição a esse parasita (International Commission on Trichinellosis). Em Portugal, há o Regulamento (CE) n.º 854/2004 do Parlamento do Conselho Europeu, de 29 de Abril de 2004, “que estabelece as regras específicas de execução dos controlos oficiais de produtos de origem animal destinados ao consumo humano”, e o regulamento (CE) n.º 1665/2006 que revogou o 2075/2005 (Commission Regulation, 2005), “que estabelece regras específicas sobre os controlos oficiais de *Trichinella* na carne”. Estes

regulamentos e orientações abrangem tanto o abate sanitário, como a transformação pós-abate (por exemplo, congelamento e culinária). A capacidade de algumas destas espécies tolerarem o congelamento, puseram em dúvida a eficiência da congelação como método comercial para inactivar as larvas de *Trichinella* spp. em carne destinada ao consumo humana (Pozio & Murrelli, 2006).

Em Portugal, não há informação de casos de triquinelose humana recentemente diagnosticados. No entanto, existe o risco potencial de aparecimento de infecções humanas, atendendo ao crescimento da criação de porcos em regime extensivo e à confirmação recente da existência de *Trichinella* em ciclo silvático (Magalhães *et al.*, 2004), e, por outro lado, à localização geográfica de Portugal contigua a Espanha, país onde *Trichinella* spp. existe de forma endémica. Estas permissas levaram-nos a escolher como objecto de estudo o parasita *Trichinella spiralis* no sentido de aprofundar o conhecimento a nível biológico e imunológico, tentando contribuir de alguma forma para a elaboração de um diagnóstico indirecto mais rápido. Assim, o presente estudo teve como objectivos:

- Obter antígenos das diferentes fases do ciclo de vida do parasita;
- Avaliar os antígenos obtidos a nível imunológico e molecular, no que respeita à sua aplicação no diagnóstico serológico;
- Identificar anticorpos expressos durante o período de infecção que possam ser “marcadores” de infecção activa.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e métodos

3.1 - Modelo animal

Existem vários modelos murinos relevantes em experimentação animal, que representam o espectro das doenças humanas e que são úteis para analisar e caracterizar a resposta imunitária do hospedeiro a diferentes helmintas (Gause, 2003).

O presente estudo foi desenvolvido em 40 ratos (*Rattus rattus*), fêmeas com cerca de 8 semanas de idade e aproximadamente 167,6 gramas de peso, criados no biotério do Instituto Medicina Higiene Tropical (IHMT). Os trinta animais foram separados em cinco grupos, tendo cada um seis animais (Figura 15), os restante roedores (10 animais) foram usados como controlos (sem infecção).

Os ratos foram colocados em caixas individuais e mantidos no biotério em condições de temperatura, humidade e luminosidade adequadas, de acordo com as leis em vigor.



Figura 15 – Ratos mantidos no biotério (original de P. Marques).

Um dia antes da infecção, alterou-se a dieta, retirando-se a comida e ficando apenas com água. Antes da infecção, efectuou-se o exame parasitológico das fezes de todos os ratos, utilizando-se o método de Willis (Rey, 2001). Esta técnica tem como objectivo diagnosticar a presença de ovos de helmintas intestinais com base no princípio da flutuação. Assim, num tubo de Willis são dissolvidas um a dois gramas de fezes às quais é adicionada uma solução de cloreto de sódio saturada (NaCl), coloca-se por cima uma lâmina de vidro e aguarda-se 10 minutos. Se houver ovos de helmintas estes vão ascender e aderir à lâmina, podendo depois ser visualizados ao microscópio.

3.2 - Infecção experimental

3.2.1 - Obtenção de larvas enquistada de *Trichinella spiralis*

Desde há alguns anos que são mantidas na Unidade de Helminologia e Malacologia Médica (UHMM) quatro estirpes europeias de *T. spiralis*. Neste estudo utilizámos a estirpe proveniente de Espanha.

Para a infecção dos ratos, foi necessário proceder à dissecação de ratos previamente infectados na UHMM com a estirpe de *T. spiralis* em estudo. Assim, procedeu-se ao sacrifício dos ratos colocando-os individualmente dentro de um recipiente de vidro contendo algodão embebido em clorofórmio. Após a morte, o rato foi imobilizado e colocado sobre a placa de dissecação, sendo fixadas as extremidades com alfinetes de dissecação. Com auxílio de uma pinça e tesoura foi aberta a cavidade abdominal, estendendo as incisões em direcção a cada extremidade, tendo o cuidado de expor bem as massas musculares dos membros anteriores e posteriores, do pescoço e mandíbula. Com a ajuda da pinça e de um bisturi retiraram-se as massas musculares dos membros superiores e inferiores, masseteres, língua e diafragma. Destes órgãos cortaram-se pequenos fragmentos de aproximadamente 2 a 3 mm e colocaram-se no triquinoscópio para observação das larvas enquistadas.

3.2.2 - Preparação da dose infectante

Para provocarmos uma infecção com 1500 larvas nos ratos em estudo, procedemos à observação, através do microscópio invertido, dos fragmentos de carne retirados e colocados no triquinoscópio. Com base no número de larvas existentes em um grama de carne, calculou-se o número de gramas de carne necessário para provocar a infecção.

Os ratos foram então infectados oralmente pela administração de fragmentos de carne parasitada com *T. spiralis*, envoltos em miolo de pão.

3.2.3 - Recolha de parasitas adultos

Para a recolha dos parasitas adultos de *T. spiralis* sacrificaram-se os ratos no 14º dia após “infecção”. Para tal, fez-se uma incisão transversal na região abdominal, removeu-se a pele para as extremidades anterior e posterior e, após abertura do abdómen, retirou-se cuidadosamente o intestino delgado. Com ajuda de uma tesoura abriu-se o intestino longitudinalmente, procedendo-se à sua lavagem com soro fisiológico seguido de incubação na estufa a 37°C, durante uma hora.

Após incubação, retirou-se todo o conteúdo do lúmen intestinal e após nova lavagem com soro fisiológico, colocou-se o intestino num funil com filtros de três diâmetros diferentes, deixando o filtrado em repouso para sedimentação dos parasitas. Em seguida decantou-se o sobrenadante, colocou-se o sedimento numa placa de Petri e observou-se ao microscópio a presença de parasitas adultos de *T. spiralis*.

A identificação dos parasitas recolhidos foi feita por exame das características morfológicas.

3.3 - Obtenção de antígenos (Ags) de larvas recém-eclodidas (*Newborn*) e de larvas enquistadas (L1)

3.3.1 - Isolamento de larvas recém-eclodidas (*Newborn* - LNB) de *T. spiralis*

Para a obtenção de larvas recém eclodidas - LNB e em fase de migração, sacrificaram-se os animais no 19º dia após infecção. O isolamento das larvas LNB foi efectuado pela técnica de Baerman modificada, uma vez que pela técnica da digestão péptica (de referência para larvas de *T. spiralis*) não foi possível isolar as larvas recém eclodidas dos detritos de matéria orgânica.

A técnica de Baermann é usada para isolar pequenos parasitas de nemátodes provenientes de materiais sólidos tais como as fezes, terra e tecido animal (Eriksen, 1982). O seu princípio baseia-se no hidrotropismo e no termotropismo das larvas e na tendência destas em sedimentar, quando estão em contacto com água (Slotved *et al.*, 1996 e Rey, 2001).

No presente trabalho, o tecido muscular do rato foi cortado em pedaços minúsculos, os quais foram colocados sobre uma gaze que revestia um passador metálico, adaptado a um recipiente com água a 37°C e, seguidamente, colocado na estufa durante uma hora a 37°C, obtendo-se assim larvas *Newborn* livres de resíduos.

3.3.2 - Antígeno de excreção-secreção de larvas *Newborn* de *T. spiralis* (AgESNBL)

Para obter o antígeno de excreção/secreção de larvas *Newborn*, procedeu-se ao isolamento das larvas pela técnica de Baermann modificada. Os fragmentos da carne dos músculos do rato obtidos foram colocados sobre uma camada de lenços duplos finos de algodão (do tipo *Kleenex*) e colocados sobre um passador metálico, em frasco esterilizado contendo meio de Hank's Balanced Salt Solution–HBSS (Sigma–Aldrich, USA) com 100 µl/ml de Penicilina e 250 µg/ml de estreptomicina e incubado *overnight* na estufa a 37°C, a uma atmosfera de 5% de CO₂.

3.3.3 - Antígeno total de larvas enquistadas (L1) de *T. spiralis* (AgT)

Para a preparação de antígeno total de *T. spiralis* efectuou-se a digestão péptica do tecido parasitado, segundo o protocolo usado na UHMM (Anexo 1), a fim de se obter as larvas L1 livres de matéria orgânica, às quais se juntou 5 ml de solução salina (0,9% de NaCl) e congelou-se a -20°C, até à preparação do respectivo antígeno (AgT).

Depois da descongelação, a solução contendo larvas foi sonicada (MSE Ultrasonic Power), procedendo-se a 8 ciclos de um minuto com 30 segundos de intervalo. Durante todo o processo, os tubos contendo as larvas foram mantidas em banho de gelo. No final, fez-se a observação microscópica entre lâmina e lamela para verificar o grau de desintegração das larvas. Uma vez desintegradas, congelou-se a solução e após 24 horas fez-se a maceração em almofariz de porcelana.

A suspensão foi depois centrifugada a 2500xg durante 60 minutos e o sobrenadante, contendo o antígeno “bruto”, foi acondicionada a 4°C até à análise da sua concentração proteica e reactividade.

3.3.4 - Preparação do antígeno de excreção-secreção das larvas enquistadas L1 (AgESL1)

Para a preparação de antígeno excreção-secreção das larvas L1 enquistadas (AgESL1) procedeu-se à obtenção das larvas L1 por digestão péptica (protocolo da UHMM). Após a recolha das larvas L1, colocaram-se em frasco esterilizado contendo meio de Hank's Balanced Salt Solution-HBSS (Sigma-Aldrich, USA) com 100 µl/ml de Penicilina e 250 µg/ml de estreptomicina e incubado *overnight* na estufa a 37°C, a uma atmosfera de 5% de CO₂.

3.3.5 – Preparação de antígeno de larvas L1 após incubação em meio de Hank's (AgS)

Após a obtenção do antígeno de excreção-secreção, as larvas L1 mantiveram a integridade e mobilidade. Com o objectivo de avaliar a antigenicidade residual destas larvas L1 após incubação em meio de Hank's e atendendo a que estas se mantinham viáveis e móveis, procedeu-se a preparação de um antígeno “somático” destas larvas (AgS), pelo processo descrito em 3.3.2.

3.3.6- Concentração dos antígenos de excreção-secreção (AgESNBL e AgESL1)

Foram usados tubos com filtros centrifugadores Millipore's® Amicon Ultra-15 10K que permitiram concentrar o antígeno de excreção/secreção antes da determinação da proteína.

3.3.7 Determinação da concentração da proteína dos antígenos

A concentração de proteínas dos antígenos obtidos, quer de larvas *Newborn* quer de larvas L1 de *T. spiralis* (total e de excreção/secreção), foi determinada pelo método de Bradford utilizando o “kit Bio-Rad protein assay”.

3.4 Obtenção dos soros para avaliação da reactividade dos antígenos

Os soros foram obtidos de sangue colhido por punção cardíaca logo após o sacrifício dos ratos infectados e, no caso dos ratos de controlo, o sangue foi colhido da cauda directamente para papel de filtro.

3.5 Avaliação dos antígenos por métodos imunológicos

A reactividade dos antígenos obtidos foi testada pelas técnicas de imunodifusão e imunoelectrodifusão em gel de agarose, utilizando-se um soro de rato com 45 dias de infecção.

3.5.1 Reacção de Imunodifusão em gelose (ID)

A técnica mais utilizada é a de Ouchterlony, ou seja, dupla difusão em gelose. O seu princípio é bastante simples e consiste em colocar o soro e o antígeno em orifícios, com um determinado diâmetro, escavados num suporte de gel de agar, a uma distância determinada e aguardar a respectiva difusão. Na zona de equivalência formar-se-á um traço de precipitação. A sensibilidade deste método é diminuída pela difusão radial, quer de antígenos quer de anticorpos (Golvan & Ambroise-Thomas, 1984). É uma técnica pouco sensível, mas bastante específica.

3.5.2 Reacção de Imunoelectrodifusão em gelose (IED)

Esta técnica baseia-se num princípio idêntico ao anterior, sendo a difusão apenas acelerada pela passagem da corrente eléctrica, isto é, os anticorpos e os antígenos quando colocados num suporte apropriado e em condições precisas de força iónica e de pH, as proteínas antigénicas de um lado e as imunoglobulinas do outro migram em sentido inverso, sob acção da corrente endosmótica e da diferença de potencial. Esta migração possibilita rapidamente o contacto entre o antígeno e os anticorpos (Golvan & Ambroise-Thomas, 1984). A reacção positiva revela-se pela presença de traço ou traços de precipitação no ponto de encontro dos dois reagentes. A sensibilidade desta técnica é cerca de 10 a 20 vezes superior à anterior.

3.5.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

A determinação da sensibilidade e especificidade dos antígenos, assim como, a cinética da resposta imunitária humoral no decurso do período de infecção, foi efectuada pelo método de ELISA.

A metodologia aplicada na técnica de ELISA baseou-se na descrita por Voller (1976), com algumas alterações. A técnica foi efectuada em microplacas de fundo plano. Antes de executar a técnica, foi fundamental determinar previamente a diluição dos antígenos e dos soros a aplicar nas placas. Numa primeira fase, procedeu-se à determinação da concentração “óptima” dos antígenos e dos soros através da titulação com soros controlo (positivo e negativo). O antígeno foi testado na concentração de 5,0 µg de proteína por mililitro (5µg/ml) e os soros nas diluições de 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400. Após optimização, a concentração estabelecida para os antígenos foi de 2 µg de proteína por mililitro e a diluição dos soros 1/400. O conjugado anti-IgG de rato marcado com peroxidase (IgG-HRP, Sigma), foi usado a 1/60 000, anti-IgG₁ a 1/500 e anti-IgM de ratinho conjugada com fosfatase alcalina numa diluição de 1/30 000. Utilizou-se como controlo positivo o soro de rato infectado há mais de 60 dias, sendo o controlo negativo constituído por um *pool* de soros de ratos não infectados. Este *pool* de soros negativos foi obtido de sangue impregnado em papel de filtro e processado segundo o método de Guimarães (1984). Assim, efectuou-se a eluição do sangue a partir círculos de papel de 4 cm² com 0,25 ml PBST resultando numa diluição de 1/5. Deste modo, com recurso a um furador de papel, cortaram-se círculos com 6 mm de diâmetro que foram eluídos em 1,413 ml de PBST (PBS com 0,05% Tween 20), durante 2h com agitação, para obter a diluição de 1/400.

Nas diferentes soluções utilizou-se um volume de 100 µl em cada poço da placa, com excepção do tampão de lavagem PBST em que se usaram 200 µl e da solução bloqueadora da reacção, e se aplicou o volume de 50 µl por poço. Os soros (amostras e controlos) foram testados em duplicado sendo o valor da absorvância resultante da média dos valores apresentados na leitura

de cada soro. Para cada antígeno utilizaram-se duas placas (com as mesmas amostras) que foram processadas em simultâneo.

Procedeu-se à sensibilização das placas com 100 µl de solução antigénica por poço (2 µl do Ag) diluídas em tampão carbonato pH 9,6 (15mM Na₂CO₃, 35mM HCO₃) durante 12 horas a 4°C. Após este tempo as placas foram lavadas por quatro vezes com PBST (200 µl /poço) com intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e, em seguida bloqueadas, com 1% de BSA (albumina de soro bovino, Sigma) diluída em PBST e incubadas durante 1h e 30 minutos. Procedeu-se a novas lavagens como anteriormente, colocaram-se os soros na diluição de 1/400 em PBST, seguindo-se a sua incubação durante 2 horas à temperatura ambiente (T.A), e posteriormente 12 horas a 4°C.

Após a lavagem, reincubaram-se as placas com os diferentes conjugados. No caso da IgG (Sigma) usou-se uma diluição 1/60 000 em PBST, seguidas de incubação durante 90 minutos à T.A. Após remoção do conjugado procedeu-se a novas lavagens (PBST) e colocou-se o substrato cromogénico (9 mg de ortofenildiamina-OPD, em 25 ml de Tampão substrato (0,2M Na₂HPO₄, 0,1 ácido cítrico, pH 5,5 e 25µl de H₂O₂ a 30%), incubaram-se as placas na obscuridade durante 30 minutos e bloqueou-se a reacção com 50µl de HCl 2N. A absorvância foi lida num espectrofotómetro (Multiskan Plus P) a um comprimento de onda de 450 nanómetros (nm).

No caso do IgG₁ adicionaram-se 100 µl a cada poço, na diluição de 1/500 em PBST. Após 90 minutos de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com PBST, e procedeu-se a nova incubação com um segundo conjugado IgM anti-mouse, na diluição de 1/30 000 em PBST. Após 90 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com PBST e adicionaram-se 100 µl de substrato p-Nitrophenyl phosphate (pnNPP) (Sigma-Aldrich, USA), a cada poço. As placas foram colocadas num local escuro durante 30 min à temperatura ambiente. Findo este tempo, a reacção enzimática foi parada com 50 µl de 3N NaOH por poço. A absorvância foi lida num espectrofotómetro (Multiskan Plus P) a um comprimento de onda de 405 nm.

Na detecção de anticorpo IgM anti-*T. spiralis*, o conjugado foi usado na diluição de 1/30 000 em PBST. Após 90 minutos à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com PBST, sendo adicionado o substrato p-Nitrophenyl phosphate (pnNPP) (Sigma-Aldrich, USA) a cada poço (100 µl). Após 30 min na obscuridade à temperatura ambiente, parou-se a reacção enzimática com 50µl de 3N NaOH por poço. A leitura foi efectuada no leitor de microplaca (Multiskan Plus P) a um comprimento de onda de 405 nm. Após serem determinadas as densidades ópticas, nos ratos infectados experimentalmente consideraram-se positivos os soros com valores de absorvância acima do *cut-off*. Este, foi determinado através do somatório da média da densidade óptica dos controlos negativos acrescida de duas vezes o desvio padrão dos mesmos ($\bar{x} + 2SD$). Foram analisadas amostras, colectadas dos ratos, a partir do dia zero (antes da infecção) até ao 60º dia pós infecção. Simultaneamente foram ainda determinadas as densidades ópticas de dois soros de ratos infectados respectivamente com *Schistosoma mansoni* e *Toxocara canis*.

3.6 Avaliação molecular das fracções antigénicas por “Western-blot”

Com o objectivo de identificar as moléculas antigénicas que poderiam ser reconhecidas pelos soros dos ratos em diferentes fases de infecção, procedeu-se à análise das fracções de cada antígeno obtido usando um gel de poliacrilamida a 12,5% em condição reduzida.

Em todos os géis foram utilizados simultaneamente padrões de referência (BIO-RAD, Alemanha) compostos por: Miosina (Cadeia H) de 205 KD, B-Galactosidase de 116 KD, Fosforilase b de 97,4 KD, Soro Albumina Bovina de 66 KD, Albumina de Ovo de 45 KD, Anidrase carbónica de 29 KD e Aprotinina de 24KD.

3.6.1 Electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A separação das proteínas antigénicas foi efectuada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). Para comparação utilizou-se um padrão com pesos moleculares conhecidos, procedeu-se a uma primeira electroforese aplicando os quatro antígenos em estudo no mesmo gel. A electroforese das proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5% (12,5 ml acrilamida/bis a 30%, 7,5 ml de tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 9,6 ml de água desionizada [d.d] 300 µl SDS 10%, 150 µl de persulfato de amónia [APS], 10 µl de Temed). Para a determinação dos componentes antigénicos, usou-se o sistema *Protean II*, colocou-se o gel a polimerizar em duas placas e, em seguida, adicionou-se o gel de concentração em SDS a 4% (0,88 ml de acrilamida/bis a 30%, 1,66 ml de tris-HCl 0,5 M, pH6.8; 4,06 ml de H₂O d.d, 66 µl SDS 10%, 33,4 µl de APS, 3,3 µl de Temed), deixando-se a polimerizar com o pente. Após polimerização, retirou-se o pente e colocaram-se as placas na tina de electroforese, enchendo-se os respectivos reservatórios com tampão tris-glicina-SDS (3,3 g de tris-HCl, 14,4 g de glicina e 1g de SDS) a pH 8,3. Em cada poço colocaram-se 20µl de antígeno diluído (1:1) em tampão da amostra (1,2 ml tris-HCl, 0,5 M pH 6,8; 4,8 ml de H₂O, 1ml de glicerol a 10%, 2ml de SDS 10%, 0,5 ml azul de bromofenol 0,025%). Submeteu-se o sistema a uma corrente eléctrica a 50 V durante 12 horas.

3.6.2 “Immunoblotting”

Para este método a electroforese de proteínas antigénicas foi realizada em sistema mini-gel (SE 250, Bio Rad). Após a polimerização do gel de separação a 12,5% de poliacrilamida em condição reduzida, foi aplicado um gel de concentração a 4%. As amostras dos quatro antígenos foram diluídas em 100 µl de tampão de amostra (1:1) e fervidas a 95°C por quatro minutos, sendo posteriormente aplicadas num mini-gel. Cada um dos antígenos correu separadamente (nos respectivos poços) e em paralelo com o padrão com β-mercaptoetanol, a uma voltagem de 60 V e à temperatura ambiente, durante um período de 1 hora e 20 minutos.

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (NC) foi realizada segundo o método de Towbin *et al* (1979). Colocou-se o gel em contacto com a membrana NC, previamente humedecida em tampão transferência (TBS)- tris glicina (25mM tris base-HCl, 192mM de glicina, 20% metanol, pH 8,3) num sistema Transphor (Hoefer, USA). A transferência realizou-se à temperatura ambiente a uma voltagem de 100 V, durante 90 minutos. O sucesso da transferência foi certificado pelo aparecimento do padrão na membrana, após coloração. A membrana foi depois bloqueada com leite magro por 2 horas e sob constante agitação, a fim de bloquear as reacções inespecíficas dos antigénios. Para a preparação da NC foi necessária a utilização de uma régua (limpa com álcool) que foi colocada em posição vertical sobre o acetato, devendo este estar colocado sobre uma folha de papel de alumínio e sobre uma superfície lisa. Com ajuda de um bisturi cortou-se a NC em tiras finas, com 2 mm de largura, de modo a serem inseridas nas ranhuras da mini-incubadora.

Os soros foram diluídos 1:100 em PBS/leite a 5% e incubados 3 horas à temperatura ambiente e durante a noite a 4°C. Seguidamente, aspirou-se a solução (leite com o soro) e procedeu-se a uma prévia lavagem com PBS-Tween e efectuaram-se posteriormente 3 novas lavagens com este tampão, sempre sob agitação, durante 5 minutos.

O conjugado anti-IgG peroxidase foi diluído 1/4000 em PBS/leite e deixou-se incubar 2 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Procedeu-se depois a 3 lavagens com PBS-Tween e uma lavagem final com PBS. Adicionou-se o substrato (800 µl de substrato -15 mg 4-cloro-1-nafetol [4CN] com 4 ml de diluente de 4CN em 36 ml de água destilada), estando com atenção ao aparecimento das bandas. Quando as tiras começaram a escurecer, parou-se com água destilada e lavaram-se as tiras 2 vezes com água destilada. Retiraram-se as tiras e colocaram-se sobre duas folhas de papel de filtro, para secarem e, de seguida, colocaram-se sobre uma folha A4 com o respectivo padrão.

O procedimento foi equivalente para os conjugados IgG₁ e IgM, apenas variando as respectivas diluições e os substratos. Assim, para a IgG₁ e IgM a diluição foi de 1/3000 e para

substrato utilizou-se BCIP/NBT (5-Bromo-4Cloro-3indolilfosfato nitroazul de tetrazólio, Sigma), que é comum para as duas imunoglobulinas.

O peso molecular das bandas foi determinado por comparação com o peso molecular dos padrões.

3.7 Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos resultados recorreu-se ao programa informático “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) versão 16 para Microsoft Windows.

Uma vez que as amostras em estudo apresentam uma distribuição diferente da curva normal, recorreu-se a testes não paramétricos. Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis para averiguar se existiam diferenças significativas de resposta imuno-humoral entre os quatro antígenos testados.

O teste de correlação de Spearman (r_s) foi usado para avaliar a expressão de anticorpos durante o período de infecção.

Os gráficos apresentados foram executados no programa informático Microsoft Excel.

4- RESULTADOS

4. Resultados

4.1 - Obtenção de parasitas adultos de *T. spiralis*

A recolha dos parasitas adultos (Figuras 16 e 17) nos ratos infectados oralmente revelou-se muito difícil, o que impossibilitou a obtenção de antígeno desta fase do parasita.

No entanto, conseguimos determinar que para uma infecção oral com 1500 larvas de *T. spiralis* é possível obter parasitas adultos ao 14º dia pós-infecção.



Figura 16 - Parasita adulto fêmea de *T. spiralis* 400x (original P.Marques.)



Figura 17 - Parasita adulto macho *T. spiralis* 400x (original P.Marques)

4.2 – Determinação da concentração proteica dos antígenos

A concentração de proteína dos diferentes antígenos (Quadro 2) foi determinada por comparação com a curva padrão pelo método de Bradford. Os valores proteicos mais elevados verificaram-se com os antígenos somáticos de larvas L1 pré e pós-incubação (AgT e AgS), enquanto que os antígenos de excreção-secreção (AgESLNB e AgESL1) apresentaram valores mais baixos.

Quadro 2 – Concentração proteica dos diferentes antígenos

Antígenos	Concentração (µg/ml)
AgT	630
AgS	1540
AgESLNB	154
AgESL1	84

AgT – Antígeno total de larvas L1

AgS – Antígeno somático de larvas L1 após incubação

AgESLNB – Antígeno de larvas recém eclodidas (*Newborn*)

AgESL1 – Antígeno de excreção-secreção de larvas L1

4.3 - Avaliação imunológica dos antígenos

4.3.1 Análise da sensibilidade e especificidade dos antígenos

Dos quatro antígenos avaliados, o AgT total (antígeno total de larvas L1) foi o que apresentou maior sensibilidade (100%) quando testado para a IgG e IgM (Figuras 18).

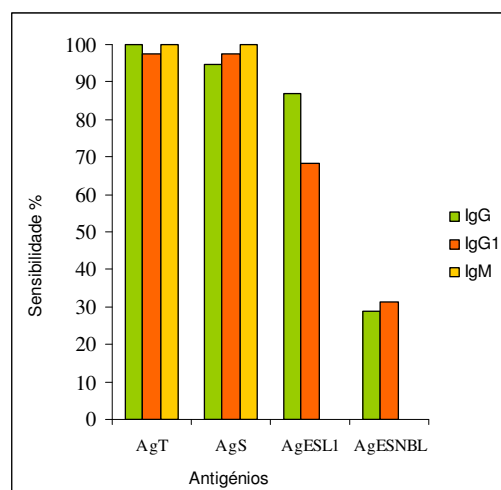


Figura 18 – Sensibilidade dos quatro antígenos

Quanto à especificidade dos quatro antígenos, apenas na detecção de IgG anti-*T. spiralis* não ocorreram reacções cruzadas com outras helmintoses, ao contrário do observado com os outros isótipos IgG₁ e IgM na presença de infecção por *Toxocara canis* (Figura 19).

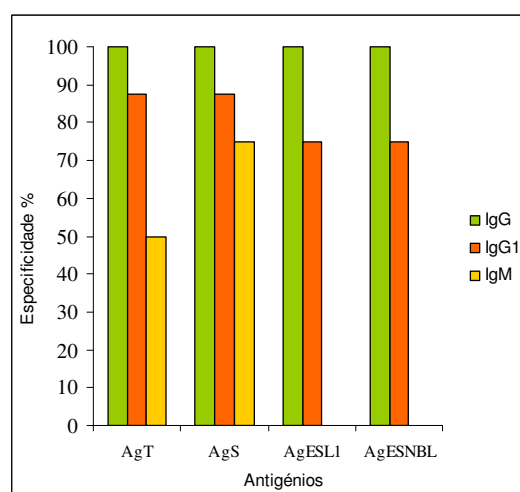


Figura 19 – Especificidade dos quatro antígenos

4.3.2 - Análise da cinética dos anticorpos IgG, IgG₁ e IgM anti-*T. spiralis* durante o período de infecção

Na análise da resposta imune das diversas classes de imunoglobulinas expressas durante período de infecção (60 dias), observaram-se variações em relação à cinética e níveis de anticorpos anti-parasita com os diferentes antígenos pela técnica de ELISA.

Assim, em relação à detecção da IgG anti-*T. spiralis* com antígeno total de larvas L1 (AgT) verificou-se não só uma subida pronunciada do título de anticorpos a partir do 11º dia pós-infecção em todos os animais infectados (Figura 20), como também o seu aumento progressivo ao longo do período de infecção (Spearman, $r_s=0,511$, $P=0,001$).

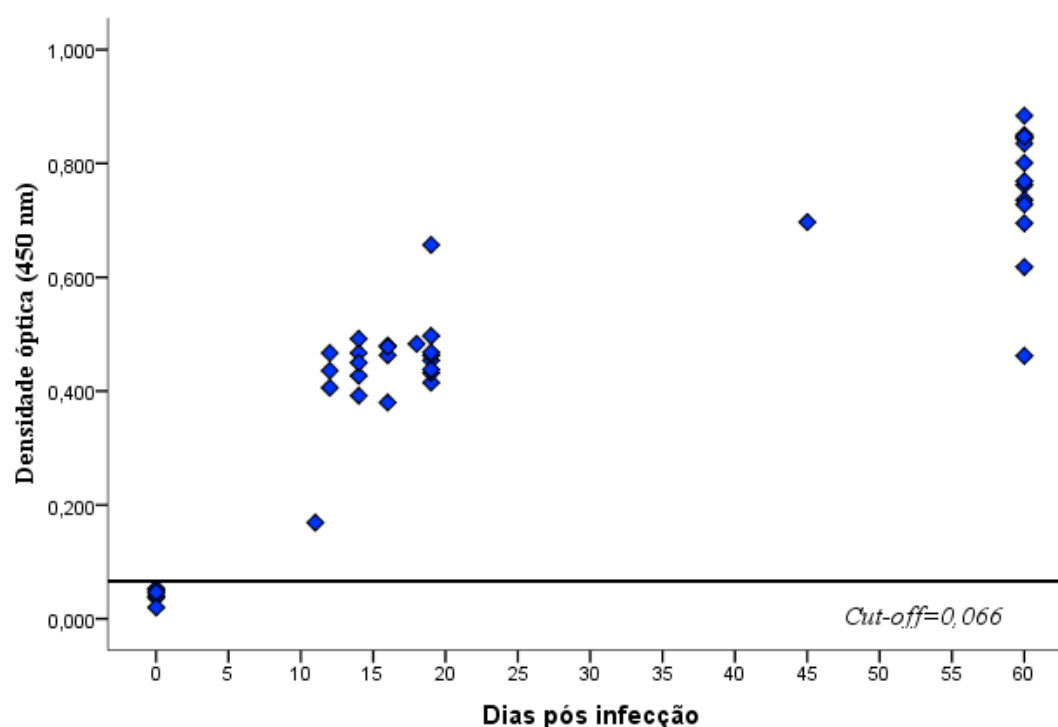


Figura 20 –Cinética dos anticorpos IgG anti-*T. spiralis*/AgT no período de infecção

Quanto ao antígeno AgS (antígeno somático de larvas L1 após incubação), também se verificou a correlação positiva dos valores de IgG ao longo do período de infecção (Figura 21), contudo os níveis séricos destes anticorpos eram significativamente inferiores comparados com os detectados com AgT (Quadro 3).

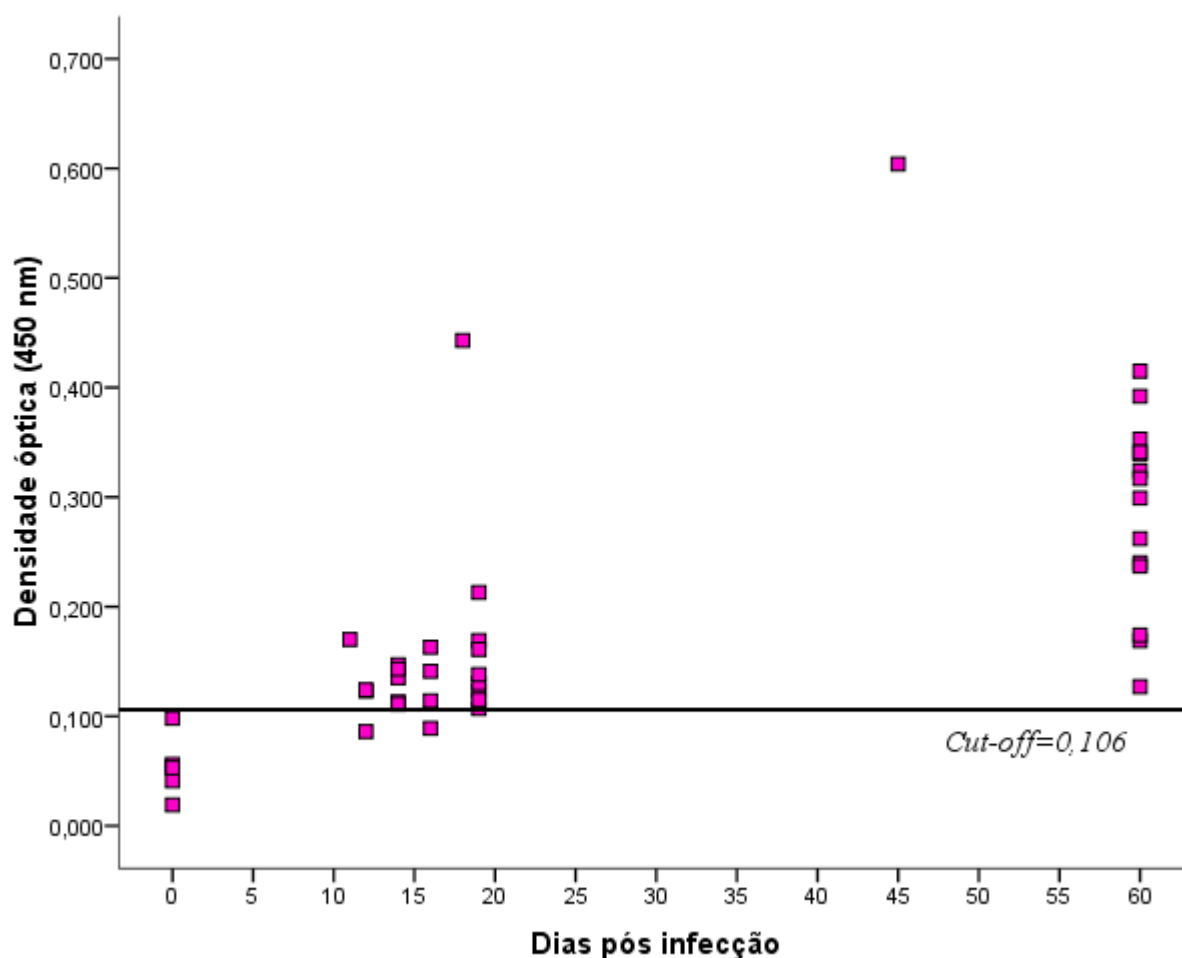


Figura 21 – Expressão dos níveis de IgG com AgS/ELISA durante o tempo de infecção

As Figuras 22 e 23 representam a evolução e os níveis séricos de IgG detectados com os dois antígenos de excreção-secreção produzidos a partir de larvas L1 (AgESL1) e de larvas *newborn* (AgESLNB). Apesar dos valores de IgG anti-parasita determinados com estes antígenos serem inferiores aos dos observados com os antígenos L1, apenas não se verificou correlação positiva entre os níveis de IgG e o tempo de infecção ($r_s=0,290$, $P=0,054$) no caso do AgESLNB (*newborn*).

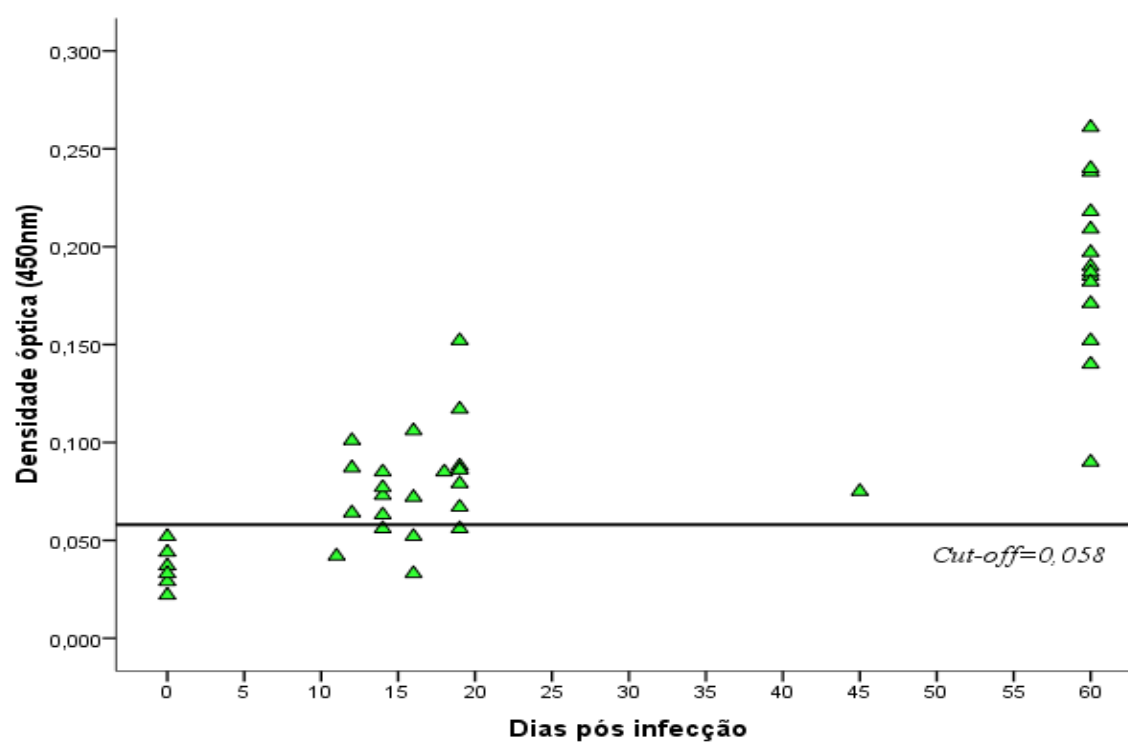


Figura 22 – Níveis séricos de IgG detectados com o AgESL1/ELISA no período de infecção.

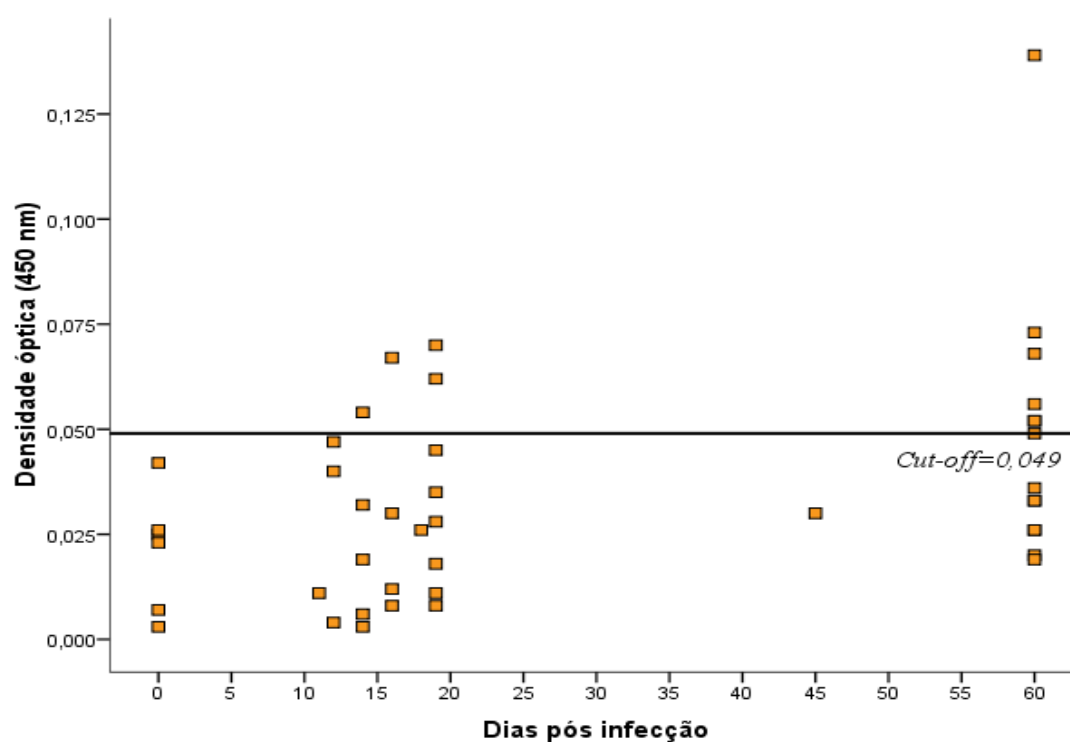


Figura 23 – Expressão dos anticorpos IgG anti-*T. spiralis* com AgESLNB (newborn)

Ao comparar-se a evolução de IgG anti-parasita, utilizando os quatro antígenos, verificaram-se variações expressivas entre os antígenos “somáticos” (L1) e os de excreção-secreção, quer a nível do período pós-infecção em que se obtiveram valores positivos de IgG (Figura 24), quer em relação aos níveis séricos doseados, em que se observaram diferenças significativas (Kruskal-Wallis, $P < 0,05$) (Quadro 3).

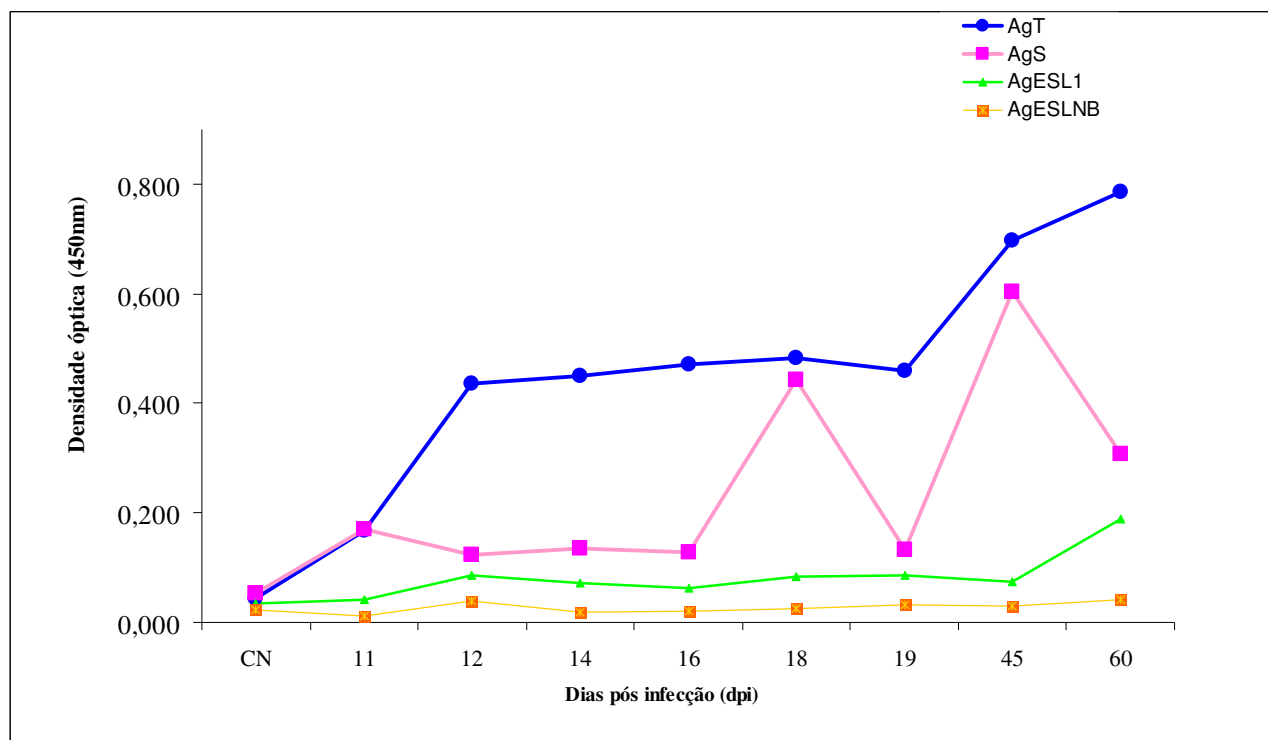


Figura 24 – Análise da resposta humoral (IgG) anti-*T. spiralis* em ratos utilizando 4 antígenos (AgT – antígeno total AgS- antígeno somático de larvas L1 após incubação AgESL1- antígeno excreção/secreção larvas L1 e AgESLNB- antígeno larvas recém eclodidas) durante 60 dias.

Quadro 3- Mediana das densidades ópticas de IgG em relação aos quatro antígenos e ao período de infecção.

Antígenos	Período de infecção (dpi)								
	0	11	12	14	16	18	19	45	60
AgT	0,044	0,169	0,436	0,450	0,471	0,483	0,459	0,697	0,785
AgS	0,054	0,170	0,123	0,135	0,128	0,443	0,134	0,604	0,308
AgESL1	0,035	0,042	0,087	0,073	0,062	0,085	0,086	0,075	0,189
AgESLNB	0,024	0,011	0,040	0,019	0,021	0,026	0,032	0,030	0,043
Kruskal-Wallis <i>P</i>	,048	,392	,022*	,000*	,004*	,392	,000*	,392	,000*

dpi – dias pós-infecção. * - Diferenças significativas.

No que se refere à IgG₁, com os antígenos somáticos L1 (AgT e AgS) o aumento do título detectou-se ao 12º dia após a infecção, sendo o perfil da evolução destes anticorpos similar nos dois casos (Figuras 25 e 26).

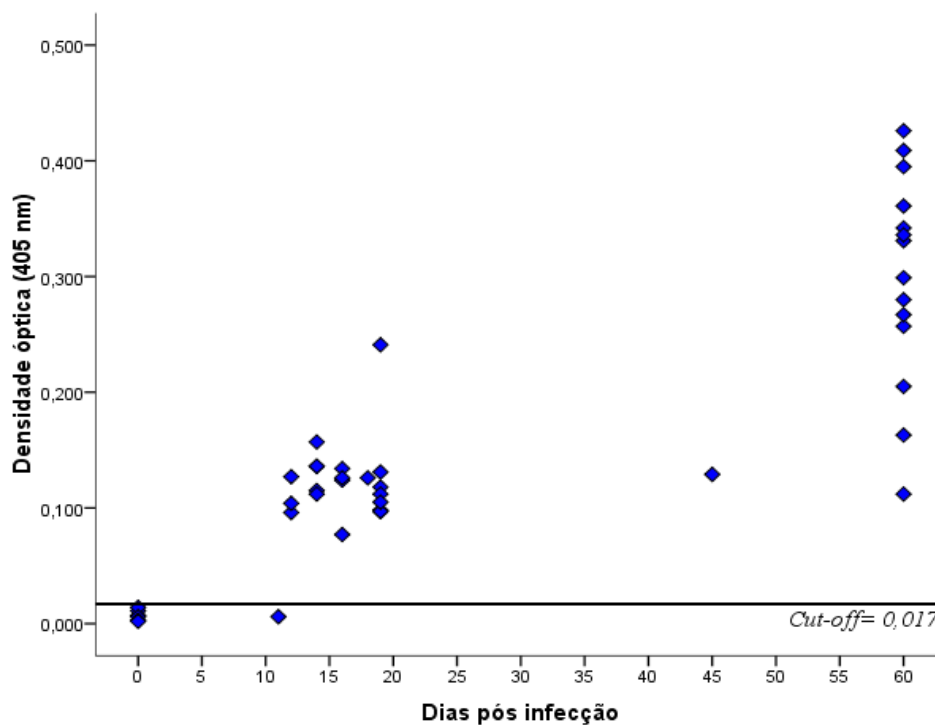


Figura 25- Densidades ópticas determinadas pelo método de ELISA para imunoglobulina IgG₁ utilizando o AgT em diferentes dias de infecção.

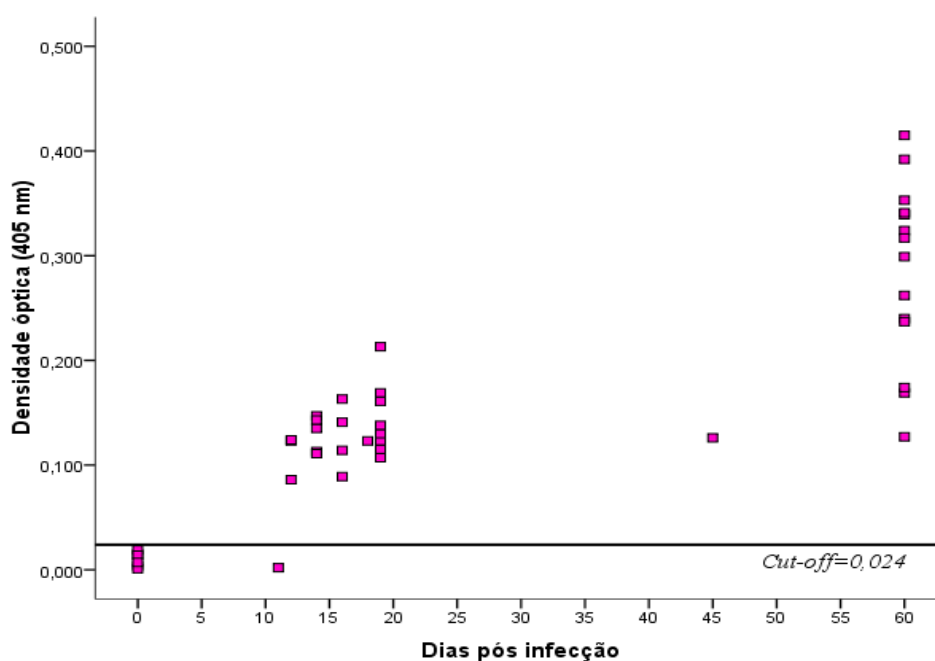


Figura 26 –Densidades ópticas determinadas pelo método de ELISA para imunoglobulina IgG₁ utilizando o AgS em diferentes dias de infecção.

Os antígenos de excreção-secreção, AgESL1 e AgESLNB, apresentaram títulos de anticorpos anti-IgG₁ variáveis (Figuras 27 e 28, respectivamente). Assim, para o AgESL1 verificou-se que a maioria dos ratos tinha níveis séricos detectáveis após o 19º dia de infecção, altura em que se visualizaram as larvas *newborn*. Em relação ao AgESLNB na maioria dos ratos o título de anticorpos anti-IgG₁ foi extremamente baixo.

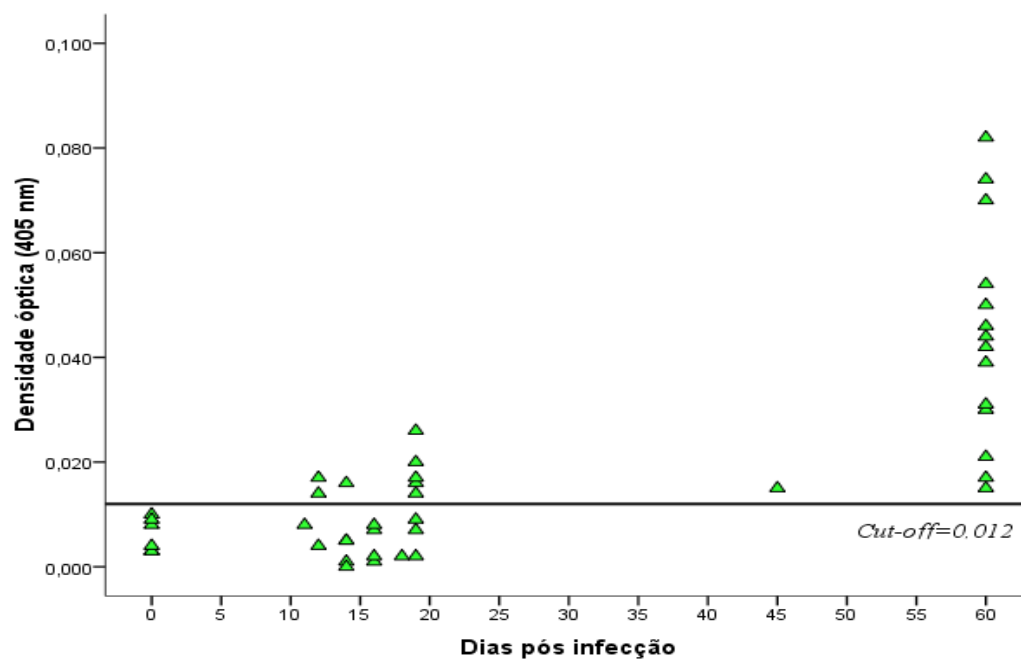


Figura 27 – Evolução de IgG₁ utilizando o AgESL1 durante o período de infecção.

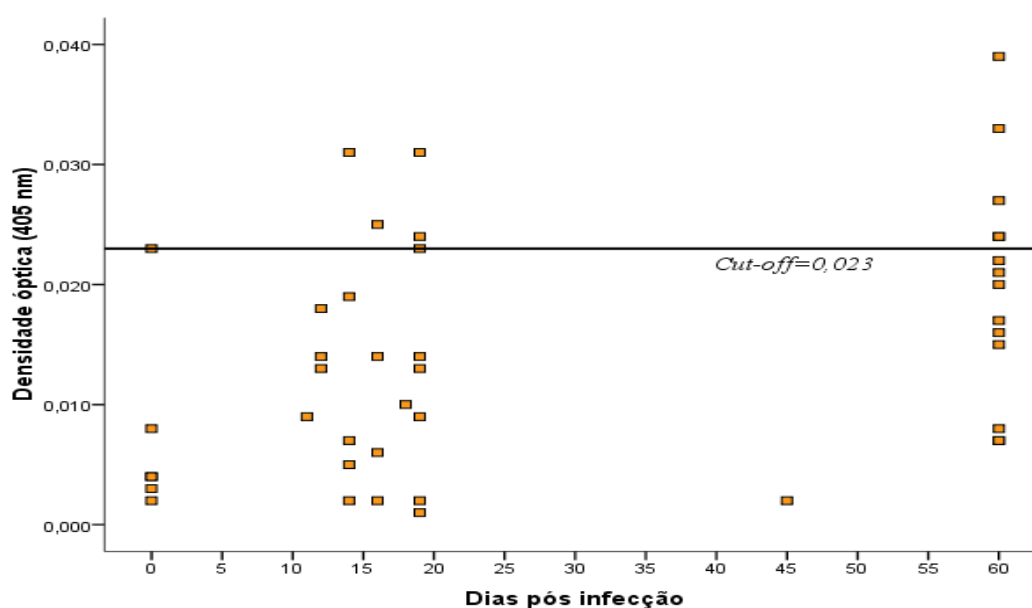


Figura 28 – Evolução de IgG₁ utilizando o AgESLNB durante o período de infecção.

Ao compararem-se os níveis de IgG₁ anti-*T. spiralis* expressos durante o período de infecção, detectados com os quatro antígenos (Figura 29), a sua expressão é mais evidente e precocemente detectável quando se utilizam os antígenos somáticos da larva L1 (AgT e AgS) do que com os antígenos de excreção-secreção (AgESL1 e AgESLNB). A partir do 12º dia de infecção, começam a verificar-se diferenças significativas quanto ao título de IgG₁ quantificado pelos antígenos em estudo (Quadro 4).

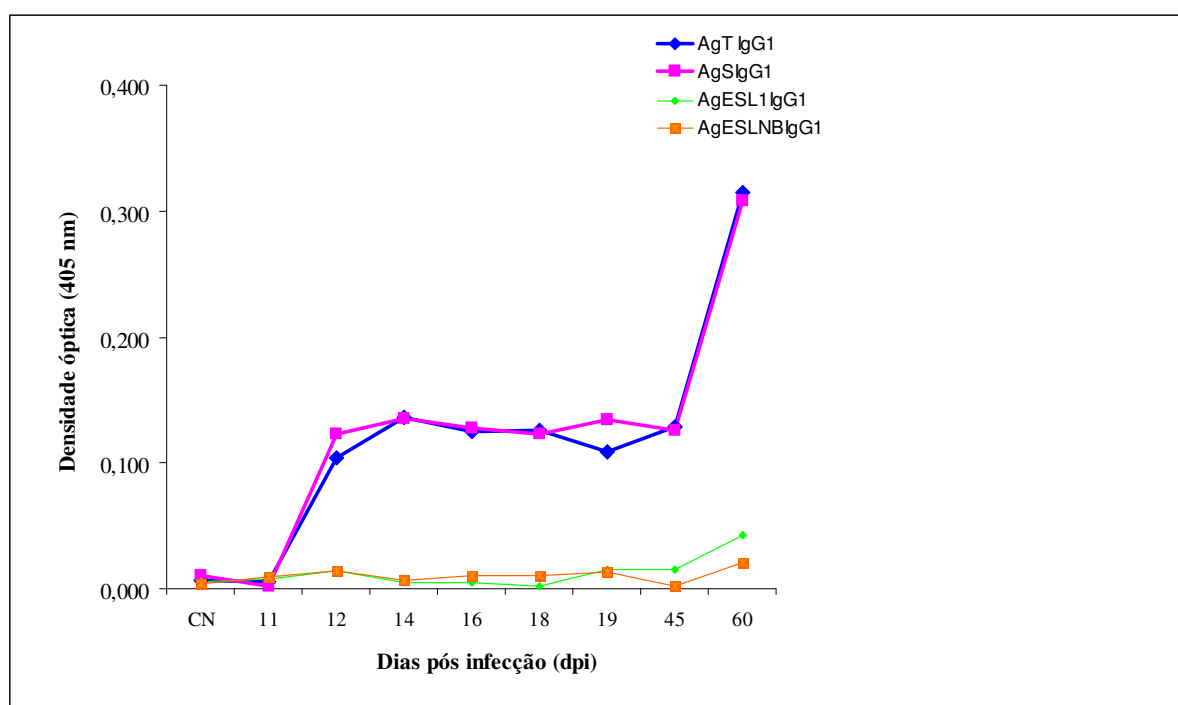


Figura 29 – Análise da resposta humoral (IgG₁) anti-*T. spiralis* em ratos. Mediana dos níveis séricos das amostras utilizando 4 antígenos (AgT, AgS, AgESL1 e AgESLNB) durante 60 dias.

Quadro 4 Mediana das densidades ópticas de IgG₁ em relação aos quatro antígenos e ao período de infecção

	Período de infecção (dpi)								
	0	11	12	14	16	18	19	45	60
Antigénios									
AgT	0,007	0,006	0,104	0,136	0,125	0,126	0,109	0,129	0,315
AgS	0,011	0,002	0,123	0,135	0,128	0,123	0,134	0,126	0,308
AgESL1	0,006	0,008	0,014	0,005	0,005	0,002	0,015	0,015	0,043
AgESLNB	0,004	0,009	0,014	0,007	0,010	0,010	0,014	0,002	0,021
Kruskal-Wallis <i>P</i>	,797	,392	,038*	,002*	,009*	,392	,000*	,392	,000*

dpi – dias pós-infecção. * - Diferenças significativas.

No que se refere à IgM anti-parasita, apenas foi possível analisar a sua evolução com os antígenos de somáticos das larvas L1 - AgT e AgS. Tanto os níveis séricos como a cinética destes anticorpos foram similares durante os 60 dias de infecção nos dois casos (Figuras 30 e 31), notando-se o seu aumento progressivo com o tempo de infecção ($r_1=0,756$ $P=0,000$)

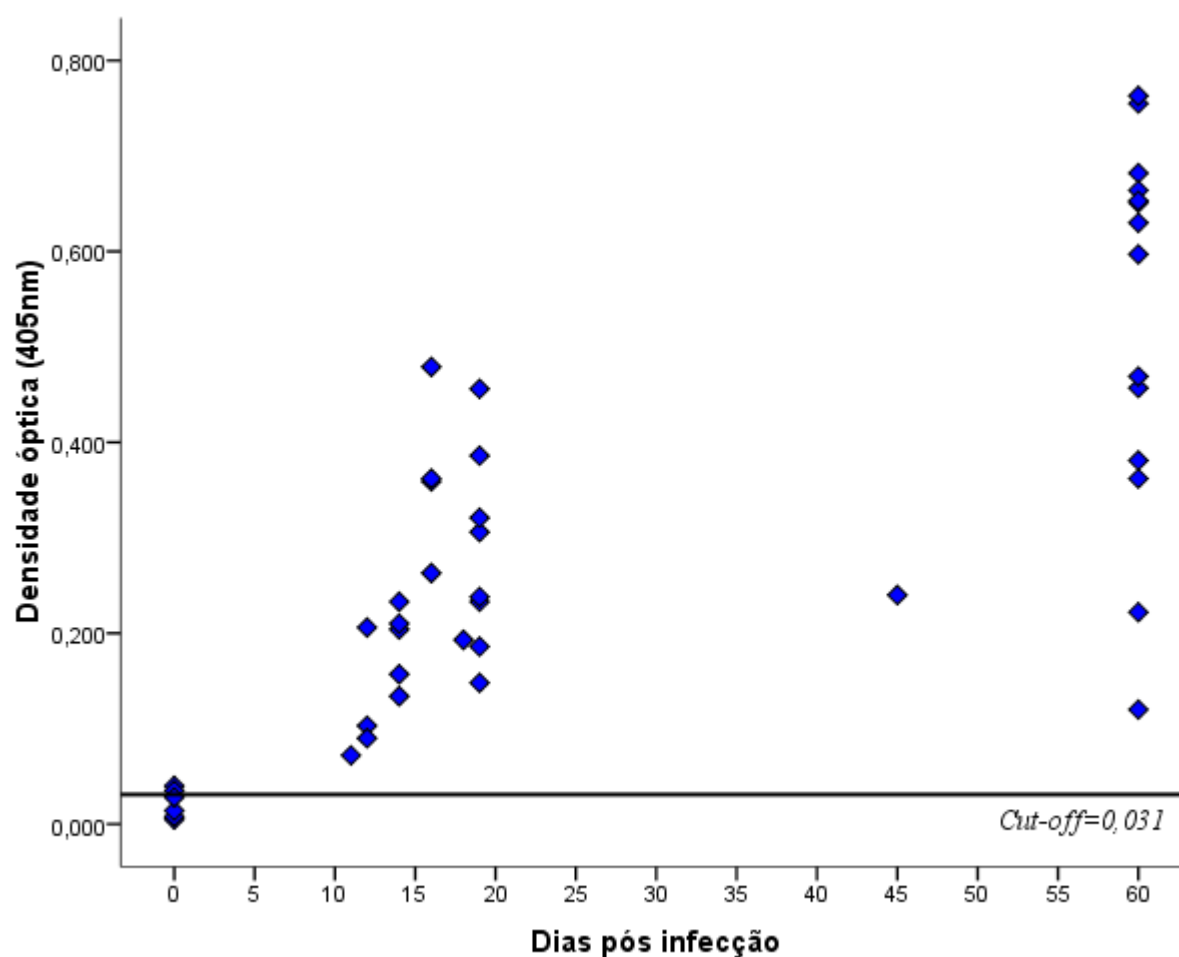


Figura 30 – Cinética dos anticorpos IgM anti-*T. spiralis*/AgT no período de infecção

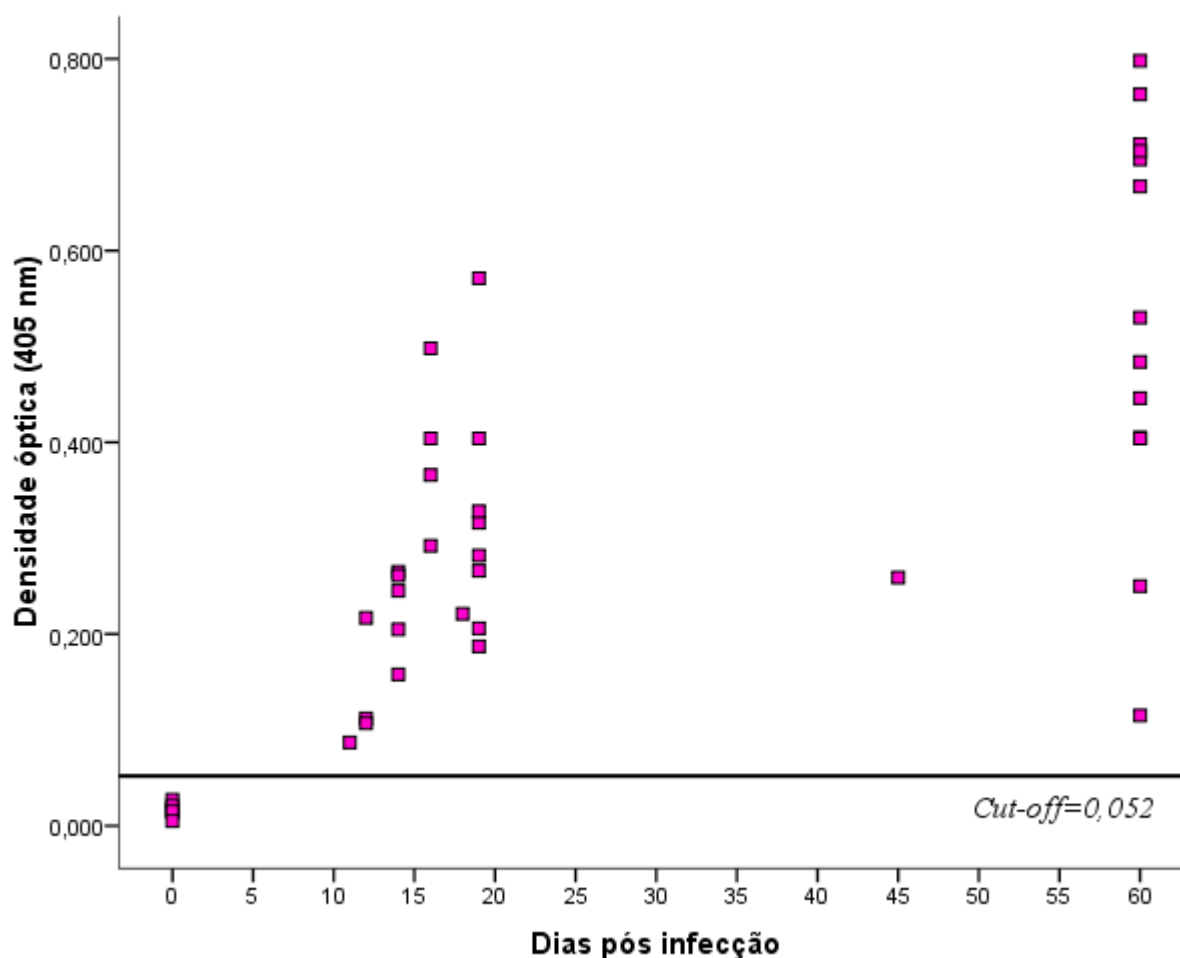


Figura 31– Expressão dos níveis de IgM com AgS/ELISA no período de infecção

Com os dois antígenos detectou-se a subida significativa de IgM ao 12º dia pós infecção, seguindo-se uma quebra do título de anticorpos por volta do 18º dia, altura em que foram observadas as primeiras larvas recém-eclodidas, voltando a subir ao 45º dia correspondente ao período em que as larvas entraram em fase de enquistamento. Não se observaram diferenças significativas em relação aos níveis séricos de IgM detectados com os dois antígenos (Quadro 5).

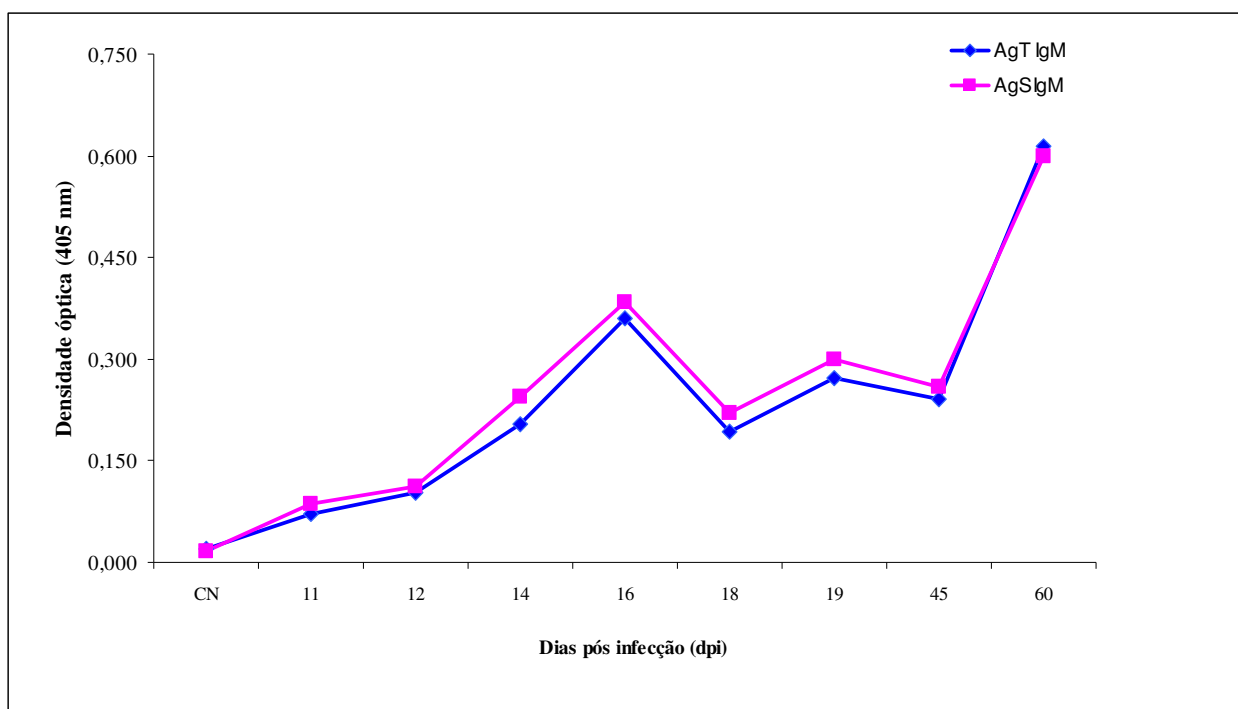


Figura 32 – Análise da resposta humoral (IgM) anti-*T. spiralis* em ratos. Mediana das densidades ópticas das amostras utilizando 2 antígenos (AgT – Antígeno total e AgS- Antígeno somático de larvas L1 após incubação) durante 60 dias.

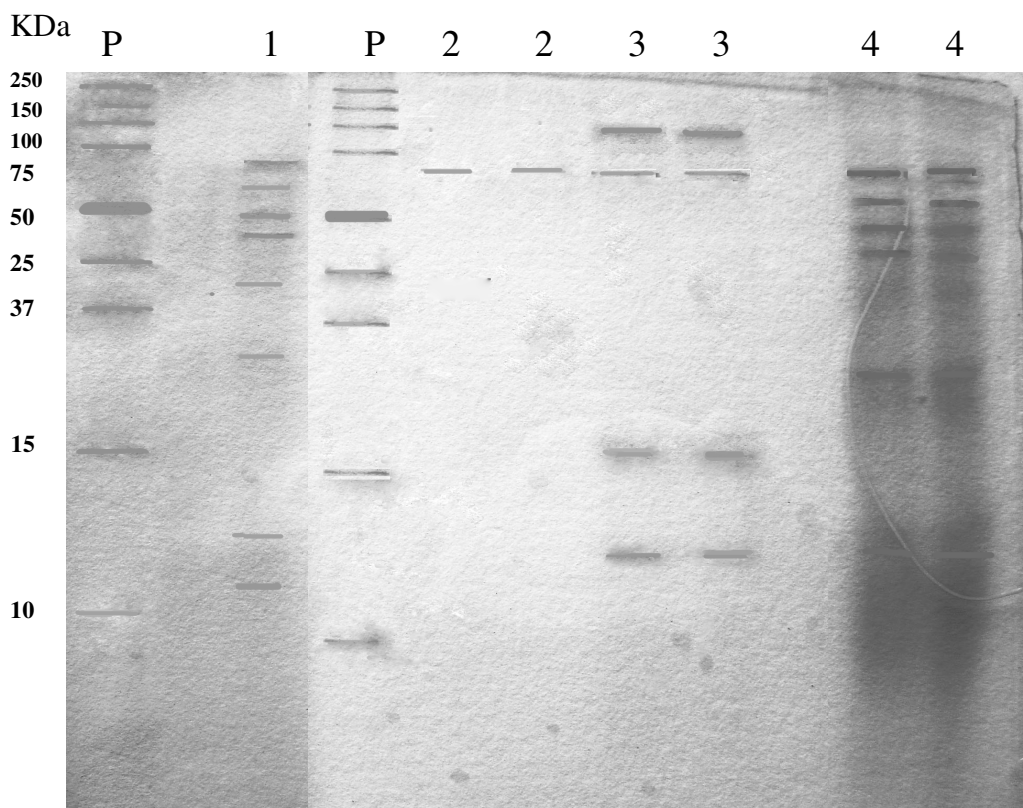
Quadro 5- Mediana das densidades ópticas de IgM em relação aos dois antígenos e ao período de infecção

	Período de infecção (dpi)								
	0	11	12	14	16	18	19	45	60
Antigénios									
AgT	0,021	0,072	0,103	0,204	0,361	0,193	0,272	0,240	0,614
AgS	0,017	0,087	0,112	0,245	0,385	0,221	0,299	0,259	0,599
Kruskal-Wallis <i>P</i>	,630	,317	,275	,117	,386	,317	,529	,317	,505

dpi – dias pós-infecção. * - Diferenças significativas.

4.4 – Separação das proteínas antigénicas por SDS-PAGE

Os diferentes antígenos foram analisados por SDS-PAGE utilizando um gel de poliacrilamida na concentração de 12,5%, revelando um número variável de proteínas com peso molecular aproximado entre 12 a 82 KD (Figura 33).



P- Padrão molecular, 1- AgT, 2-AgESLNB, 3-AgESL1, 4- AgS

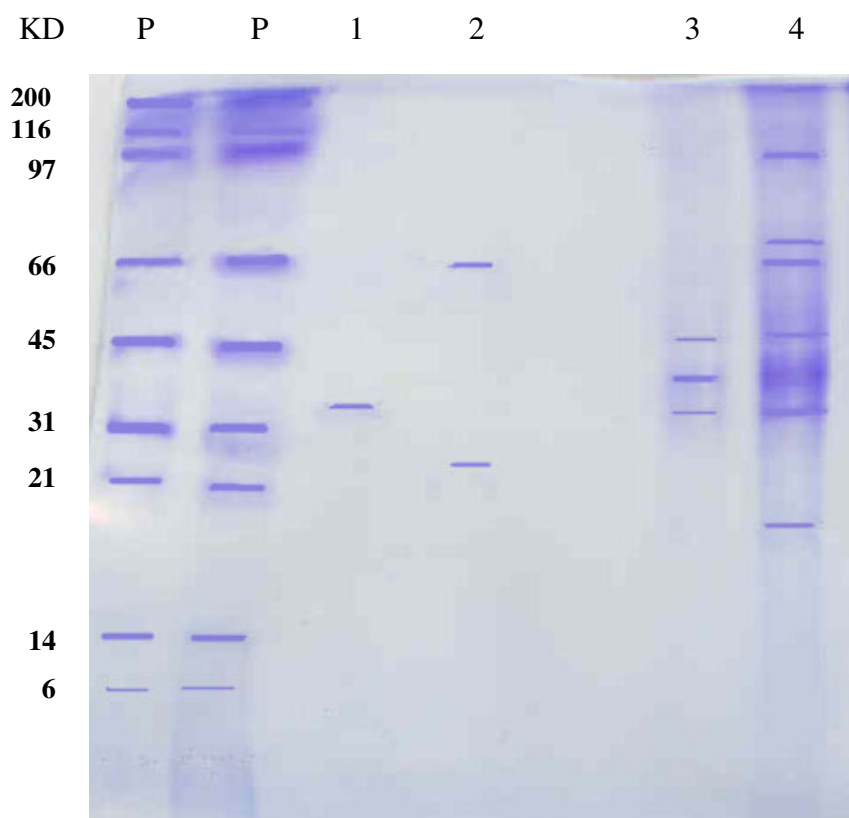
Figura 33 – Análise electroforética dos quatro antígenos em SDS-PAGE.

No entanto, o perfil de bandas e os respectivos pesos moleculares foram distintos nos quatro antígenos analisados, sendo os antígenos de excreção-secreção os que apresentaram o menor número de fracções antigénicas (Quadro 6). Assim, verificou-se que o antígeno de larvas *newborn* (AgESLNB) apresentou uma única banda de peso molecular de aproximadamente 68 KD, também presente no AgT. Por sua vez, no AgESL1 visualizaram-se duas bandas com pesos moleculares de 16 e 82 KD, apenas reveladas neste antígeno.

Quadro 6 Antígenios e respectivas bandas moleculares

	Peso das bandas moleculares (KD)											
	12	15	16	20	32	38	44	49	56	68	74	82
Antígenios												
AgT	+	+		+	+		+	+	+	+		
AgS		+		+	+	+			+		+	
AgESL1		+	+								+	+
AgESLNB										+		

Foram ainda realizados dois géis em sistema mini-gel, um na concentração de 12,5% em condição reduzida (Figura 34) e outro a 10% em condição não reduzida (Figura 35). Curiosamente, neste última concentração, o AgESL1 revelou bandas de peso molecular mais elevado 100, 150 e 200 KD (Quadros 7 e 8).

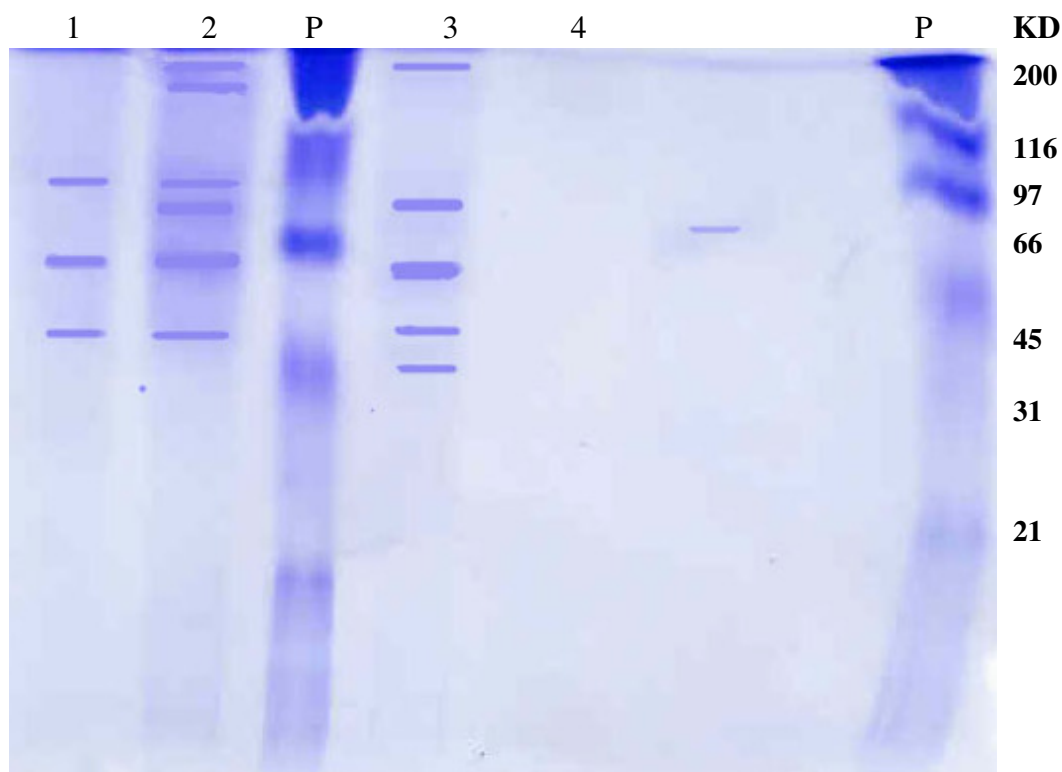


P- Padrão molecular; 1-AgESLNB; 2-AgESL1; 3-AgT; 4-AgS

Figura 34- Análise electroforética dos quatro antígenios em SDS-PAGE (em baby-gel a 12,5% em condição reduzida)

Quadro 7 Antígenos e respectivas bandas moleculares em gel a 12,5%

	Peso das bandas moleculares (KD)							
Antígenos	18	28	32	42	49	68	74	94
AgT			+	+	+			
AgS	+	+	+	+	+	+	+	+
AgESL1		+				+		
AgESLNB			+					



P- Padrão molecular 1- AgESLNB 2-AgESL1 3- AgT 4- AgS

Figura 35- Análise electroforética dos quatro antígenos em SDS-PAGE num gel a 10% em condição não reduzida.

Quadro 8 Antígenos e respectivas bandas moleculares num gel a 10%

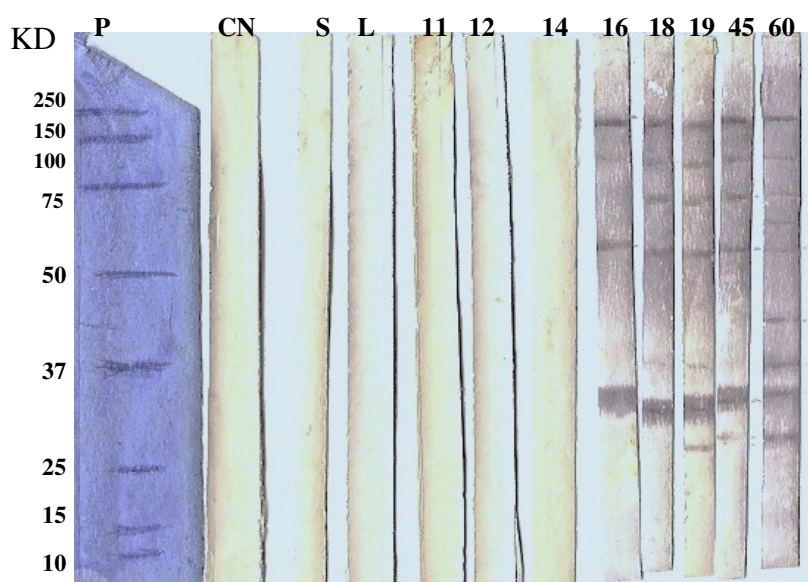
	Peso das bandas moleculares (KD)						
Antígenos	44	56	74	94	100	150	200
AgT	+	+	+	+			+
AgS							
AgESL1		+	+	+	+	+	+
AgESLNB		+	+		+		

4.5 – Avaliação da reactividade das fracções antigénicas por “Western-blot”

A técnica de *immunoblotting* foi utilizada com o objectivo de identificar as proteínas antigénicas que poderiam ser reconhecidas pelos soros dos ratos em diferentes fases de infecção. Atendendo à reduzida quantidade de antígenos de excreção AgESL1 e AgESLNB obtida, apenas se efectuou o estudo serológico para os antígenos somáticos AgT e AgS.

5.1 – Antígeno total de larvas L1 - AgT

Na detecção da IgG anti-*T. spiralis* utilizando antígeno total (AgT), as bandas de 42, 82, 114 e 250 KD foram as únicas reconhecidas por todos os soros a partir do 16º dia de infecção, reactividade que permaneceu ao longo do período de estudo (Figura 37). No entanto, verificou-se que outras bandas com pesos moleculares distintos eram especificamente reconhecidas apenas pelos soros de determinado tempo de infecção, como foi o caso das fracções proteicas de 68 e 94 KD com os soros do 60º dia pós-infecção (Quadro 9).



P- Padrão molecular, CN- Controlo negativo, S- *Shistosoma mansoni* L-*Toxocara canis* 11-60 dpi

Figura 36 - Identificação das proteínas de *T. spiralis* reconhecidas por anticorpos IgG utilizando antígeno total (AgT).

Quadro 9 - Reactividade no *Imunoblotting* de anticorpos IgG presentes nos ratos infectados por *T. spiralis* em diferentes dias pós infecção utilizando o antígeno total.(AgT)

Período de infecção	Proteínas (KD)								
	32	42	49	68	82	94	104	124	250
16º dpi		+			+			+	+
18º dpi		+	+		+		+	+	+
19º dpi	+	+	+		+		+	+	+
45º dpi		+	+		+		+	+	+
60º dpi	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ao testar-se o AgT para IgM anti-parasita, a infecção foi detectada mais cedo, ao 14º dia, evidenciada pelas bandas de 15, 56, 130 e 200 KD (Figura 37). À semelhança dos resultados obtidos pelo método ELISA, também se verificaram reacções cruzadas com soro de *Toxocara canis* especialmente a nível das bandas de 49 e 114KD. Ao 60º dia de infecção, quase todas as fracções (exceptuando as de 15 e 130 KD) apresentam reactividade com os soros dos animais (Quadro 10).

KD P CN S L 11 12 14 16 18 19 45 60



P- Padrão molecular, CN- Controlo negativo, S- *Shistosoma mansoni* L-*Toxocara canis* 11-60dpi

Figura 37 - Identificação das proteínas de *T. spiralis* reconhecidas por anticorpos IgM utilizando antígeno total (AgT)

Quadro 10 - Reactividade do AgT-IgM anti-*T. spiralis* por *Imunoblotting* durante a infecção

	Proteínas (KD)									
Período de infecção	15	49	56	68	74	98	114	130	200	250
14° dpi	+		+					+	+	
16° dpi			+				+		+	+
18° dpi							+	+		
19° dpi		+	+				+	+	+	+
45° dpi			+	+	+		+		+	+
60° dpi		+	+	+	+	+	+		+	+

Comparando a reactividade do AgT para IgG e IgM anti-*T. spiralis* nos soros dos ratos, há a salientar a presença de três fracções comuns (49, 68 e 250 KD) reactivas com os dois anticorpos. Contudo o padrão de reconhecimento foi distinto para a maioria das proteínas antigénicas, sendo as de 42, 82, 104, 124 e 250 KD as reconhecidas com maior frequência no caso dos anticorpos IgG, enquanto que para IgM foram as fracções com pesos moleculares de aproximadamente 49, 56, 114, 200 e 250 KD (Figuras 38 e 39).

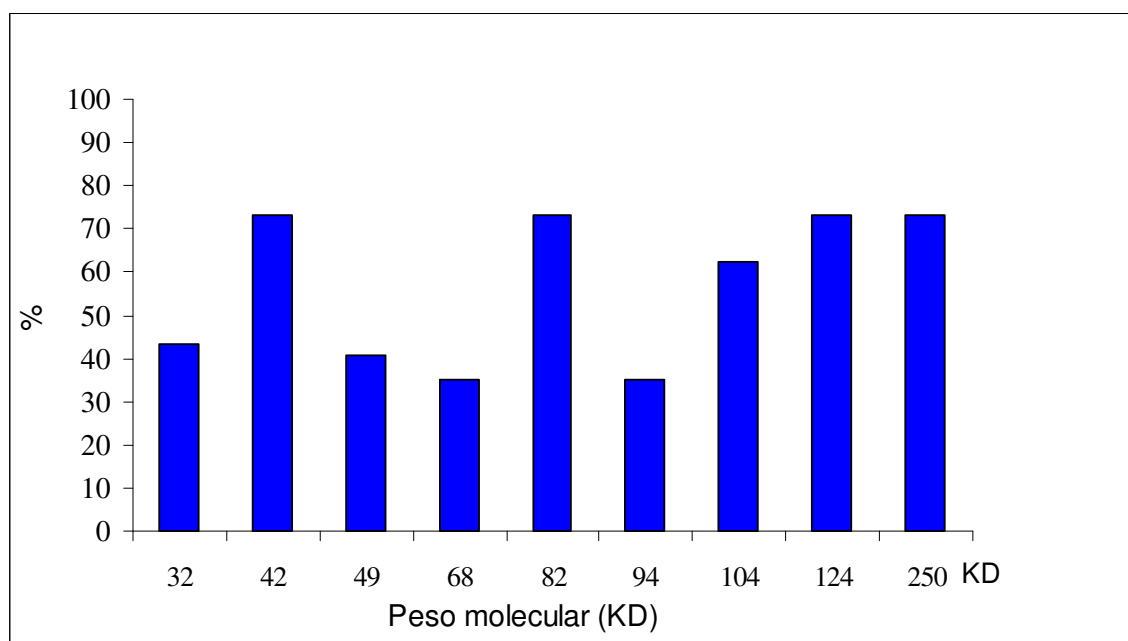


Figura 38 –Frequência das fracções antigénicas do AgT reactivas para IgG.

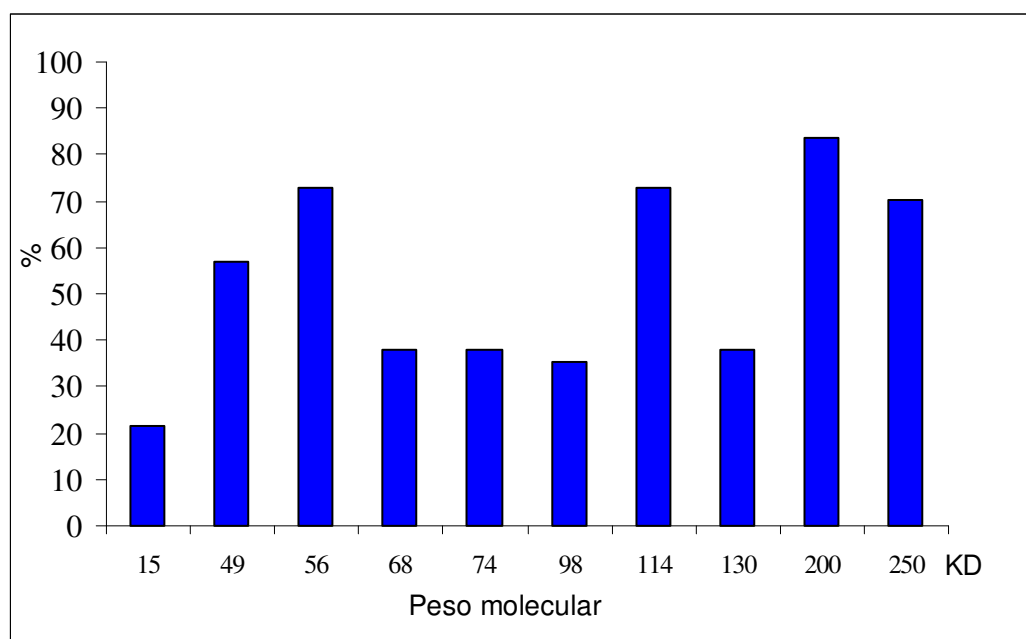
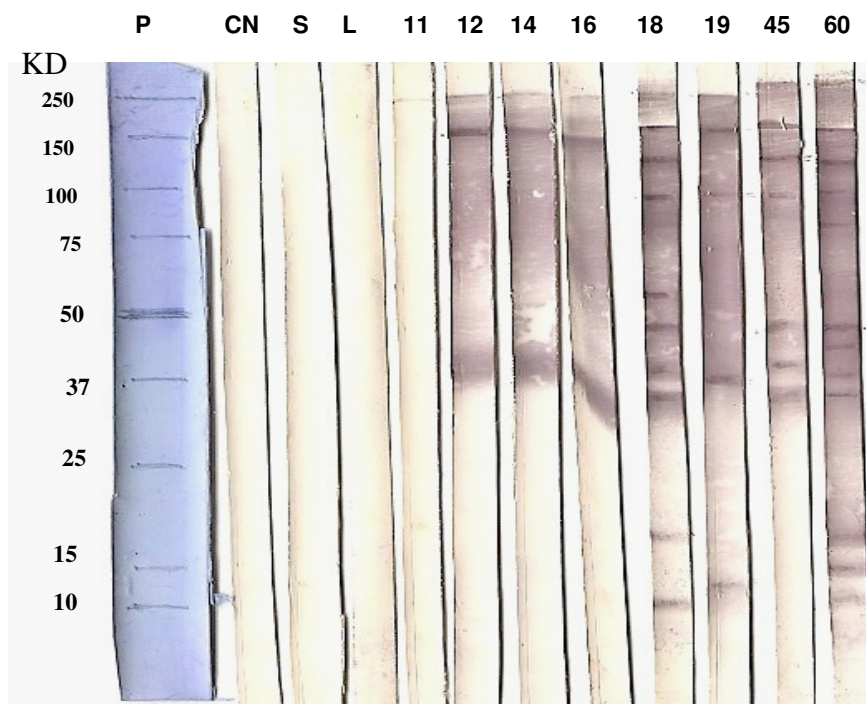


Figura 39 – Frequência de fracções antigénicas do AgT reactivas para IgM

4.5.2 – Antígeno de larvas L1 após incubação - AgS

A Figura 40 evidencia as fracções antigénicas do AgS (antígeno somático de larvas L1 após incubação) reconhecidas pela IgG anti-parasita ao longo do período de infecção, verificando-se o reconhecimento de uma banda de alto peso molecular (250 KD) logo no 11º dia de infecção, cuja reactividade se mantém constante com os soros de diferentes dias. Além desta, duas outras fracções de 38 e 150 KD foram predominantes nas diferentes fases da infecção (Quadro 11), enquanto que para algumas fracções antigénicas parece haver alguma especificidade de fase, como por exemplo a molécula de 74 KD apenas visualizada nos soros com mais tempo de infecção (60 dias).



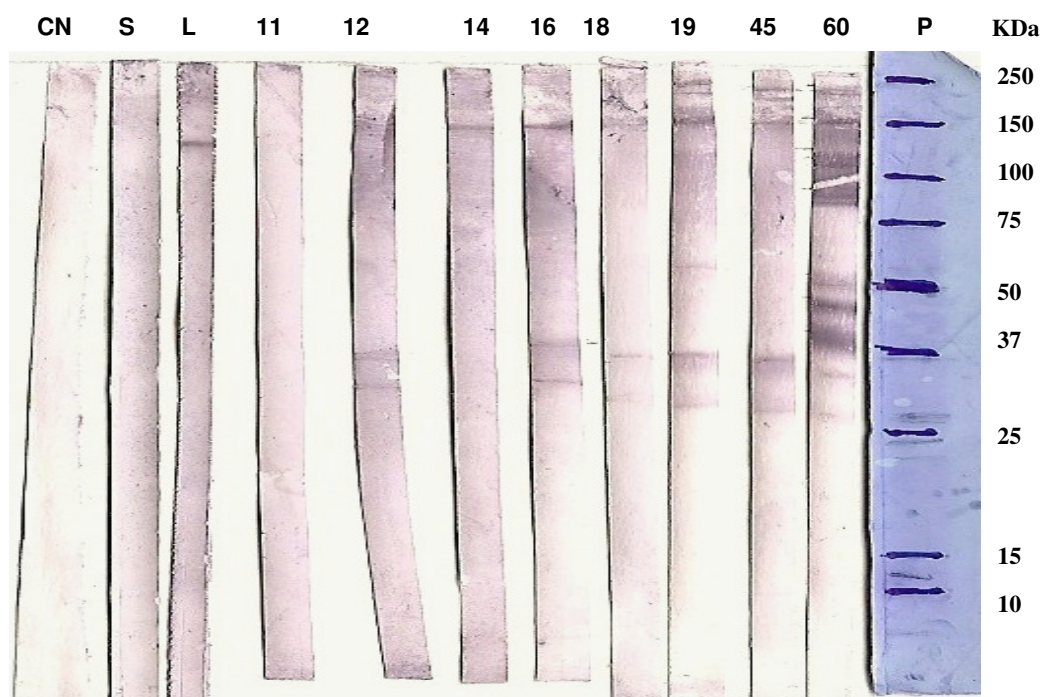
P- Padrão molecular, CN- Controlo negativo, S- *S. mansoni* L-*T. canis* (11-60 dias p.i.)

Figura 40 - Identificação das proteínas de *T. spiralis* reconhecidas por anticorpos IgG utilizando AgS.

Quadro 11 - Reactividade das fracções do AgS para IgG em diferentes dias pós infecção

Período de infecção	Proteínas (KD)											
	10	15	20	32	38	42	62	74	98	114	150	250
11° dpi												+
12° dpi					+						+	+
14° dpi					+						+	+
16° dpi					+						+	+
18° dpi	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
19° dpi		+			+				+		+	+
45° dpi				+	+	+				+	+	+
60° dpi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Na detecção da IgM, as fracções do AgS mais reactivas foram as de 42 e 200 KD (Figura 41) e apenas se verificou reacção cruzada com *T. canis* a nível da banda de 150 KD. A frequência das fracções proteicas reactivas ao longo da infecção encontra-se resumida no Quadro 12.



P- Padrão molecular, CN- Controlo negativo, S- *Shistosoma mansoni* L-*Toxocara canis* 11-60dpi

Figura 41- Identificação das proteínas de *T. spiralis* reconhecidas por anticorpos IgM utilizando AgS.

Quadro 12 - Reactividade no *Imunoblotting* de anticorpos IgM presentes nos ratos infectados por *T. spiralis* em diferentes dias pós infecção utilizando o AgS.

	Proteínas (KD)								
Período de infecção	32	38	42	56	68	114	150	200	250
12 dpi		+	+						
14 dpi								+	
16 dpi		+	+					+	
18 dpi	+		+					+	+
19 dpi	+		+					+	+
45 dpi	+		+		+			+	+
60 dpi	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Na detecção de IgG e IgM anti-parasita, o AgS revelou um padrão de fracções reactivas diferente (Figuras 42 e 43). Com efeito, no caso da IgG, foram as fracções de 38, 98, 150 e 250 KD e, para IgM, as de 32, 42, 200 e 250 KD as reconhecidas com mais frequência.

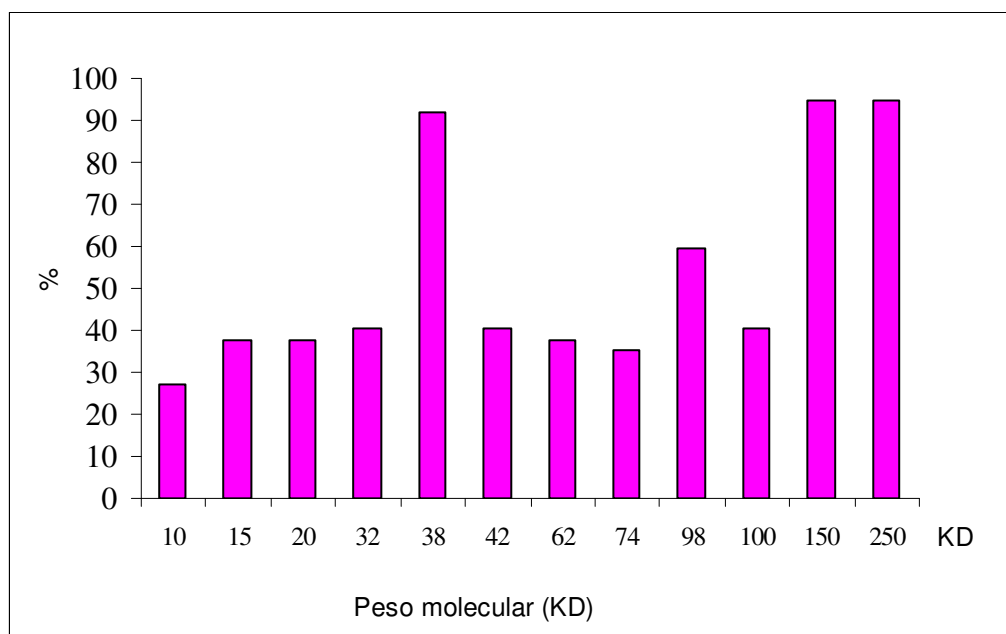


Figura 42- Percentagem de fracções proteicas do AgS que reagiram com anticorpos IgG nos ratos infectados.

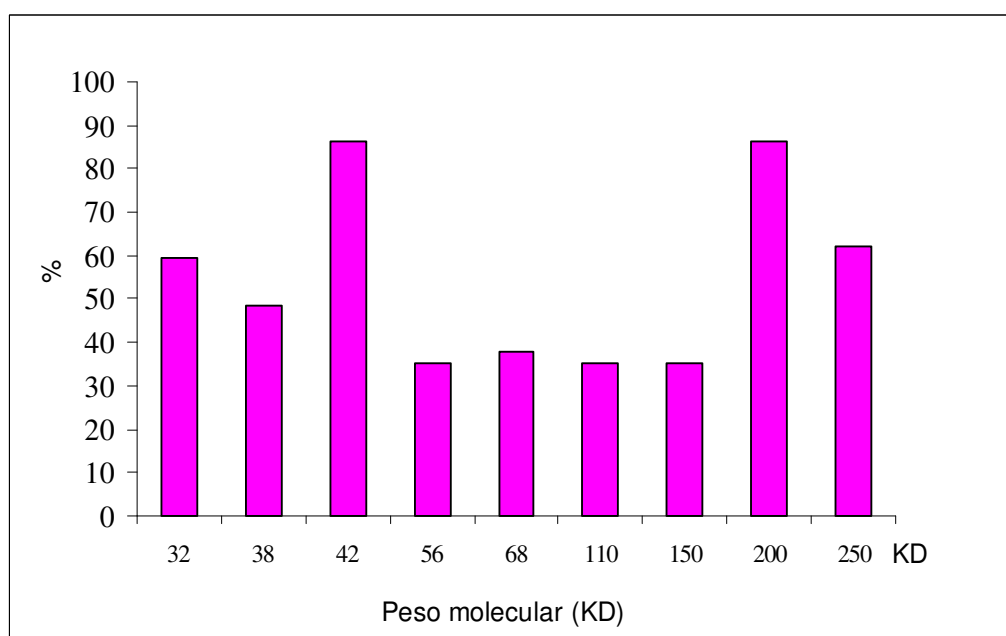


Figura 43- Percentagem de fracções proteicas do AgS que reagiram com anticorpos IgM

Apesar dos dois antígenios, AgT e AgS, apresentarem diferenças no padrão de reactividade, sendo as fracções de alto peso molecular predominantes no AgT e as de baixo peso molecular no AgS, existem moléculas antigénicas comuns (200 e 250 KD), tanto na detecção de IgG como IgM anti-*T. spiralis*. No entanto, ao contrário do antígeno total (AgT), o antígeno obtido após incubação (AgS) revelou alguma inespecificidade, em particular a nível da banda de 150 KD.

5-DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

5. Discussão e Conclusões

O desenvolvimento de métodos de diagnóstico específicos e sensíveis, que permitam a detecção da triquinelose nos animais destinados ao consumo humano, é uma das prioridades manifestada pela International Commission on Trichinellosis (2000). Esta recomendação resulta do número crescente da infecção em humanos, não só em países considerados tradicionalmente endémicos, em que a situação epidemiológica se encontrava controlada, como também em regiões onde não existiam referências à sua existência (Boireau *et al.*, 2000 e Forbes, 2000).

A caracterização dos antígenos de *Trichinella* sp., assim como a identificação dos componentes da resposta imune humoral expressos durante a infecção, constituem medidas importantes para o desenvolvimento de métodos alternativos ou complementares aos exames directos actualmente em vigor (Gamble *et al.*, 2004).

A manutenção do parasita *T. spiralis* em modelos animais é o método mais usado, em investigação, quer para um melhor conhecimento da interacção parasita/hospedeiro, quer para obtenção de antígenos parasitários para o imunodiagnóstico.

A produção de antígenos exige métodos de isolamento do parasita complexos, com excepção da fase de larvas musculares (L1) em que estas são facilmente obtidas, as outras fases do ciclo são menos acessíveis.

Em relação à produção de antígenos de parasitas adultos, apesar de os termos obtido na fase intestinal, o seu número foi insuficiente para produção do respectivo antígeno. Neste estudo, os parasitas adultos só foram identificados e isolados ao 14º dia. Contudo, alguns autores (Furze & Selkirk, 2005) referem a sua presença no intestino entre o 4º e o 11º dia após a infecção. As diferenças observadas no tempo de maturação dos parasitas adultos poderão ser devidas, entre outros factores, à dose infectante, à forma de infecção e ao modelo murino por nós utilizado. Com efeito, no nosso estudo experimental, tentámos reproduzir o modo de infecção o mais próximo possível daquele que ocorre na natureza, procedendo à infecção oral de *Rattus rattus* através da administração de fragmentos de carne parasitada envoltos em miolo de pão contendo uma dose

infectante de 1500 larvas de *T. spiralis* da fase muscular. No trabalho dos autores anteriormente referidos, a infecção em murganhos foi efectuada por inoculação oral de uma suspensão contendo 500 larvas. Este modo de infecção poderá retardar e/ou inibir a activação dos mecanismos efectores da imunidade induzidos pelos antígenos das larvas libertadas pelo processo de digestão, permitindo a penetração imediata das larvas na submucosa intestinal e o seu rápido desenvolvimento à fase adulta (Mulcahy *et al.*, 2004).

No que se refere ao antígeno de larvas recém eclodidas e em fase de migração (*newborn*), o isolamento destas larvas foi efectuado pela técnica de Baerman modificada, uma vez que não foi possível isolá-las dos detritos de matéria orgânica após digestão péptica (de referência para larvas de *T. spiralis*). Consideramos que esta adaptação será uma mais valia e poderá ser útil em futuros estudos sobre esta fase do parasita.

No presente estudo, foram produzidos dois antígenos *somáticos* de larvas musculares (AgT e AgS, pré e pós-incubação, respectivamente) e dois antígenos de excreção-secreção (ES), a partir de larvas musculares (L1) e de larvas recém-eclodidas e/ou em fase de migração tissular (larvas *newborn* - LNB).

Dos quatro antígenos produzidos, os melhores resultados foram obtidos com os antígenos totais ou *somáticos* de L1 e, em particular, com o AgT (antígeno total de larvas L1). Com efeito, foi evidente a superioridade deste antígeno a nível da sensibilidade e especificidade (100%) na detecção de IgG anti-*T. spiralis* pela técnica de ELISA (Figura 18), bem como a nível molecular, traduzido pelo número de fracções antigénicas reactivas (Quadro 6). Pelo contrário, o AgESL1, resultante dos produtos metabólicos destas larvas L1 em cultura *in vitro* (antígeno de excreção-secreção), demonstrou uma menor sensibilidade do que o AgT. Resultados similares foram obtidos por Pozio *et al* (2002b) num estudo serológico efectuado em cavalos, em que as taxas de positividade de IgG anti-*T. spiralis* foram de 98% e 57% com antígenos total e ES, respectivamente.

No entanto, resultados divergentes foram encontrados por alguns autores (Gamble, 1996; Ribicich, 2000 e Korinkova *et al.*, 2008), em que salientam valores de sensibilidade e especificidade superiores com os antígenos de excreção-secreção das larvas L1, levando-os, inclusive, a sugerir a sua aplicação em ELISA, em programas de vigilância epidemiológica (porcos e cavalos) e/ou rastreio de *Trichinella* spp. em animais selvagens. Na opinião de Gamble *et al* (1988) e Bién (2007), a qualidade destes antígenos depende não só dos métodos de cultura das larvas e da adequada purificação dos antígenos, como também da estirpe de *Trichinella* utilizada, características que podem contribuir para a divergência de resultados entre os diversos estudos.

Um dos aspectos biológicos mais importantes das larvas musculares de *Trichinella* spp. é a sua resistência e manutenção do seu poder infectante mesmo em condições ambientais adversas (Pozio *et al.*, 1992b, Kapel *et al.*, 1999 e Theodoropoulos *et al.*, 2000). Neste estudo comprovou-se que as larvas L1, após um período de 48 horas em anaerobiose, mantinham não só a mobilidade como também uma elevada imunogenicidade. Com efeito, o antígeno somático produzido das larvas pós-incubação (AgS) apresentou o teor de proteína mais elevado (Quadro2), como valores de sensibilidade e especificidade para IgG quase idênticos (Figuras 18 e 19) ao produzido pelas larvas L1 sem incubação (AgT).

Quanto aos outros anticorpos doseados, IgM e IgG₁, também foi evidente a superioridade dos antígenos somáticos (AgT e AgS) em ELISA comparativamente aos de excreção-secreção (AgESL1 e AgESLNB). Relativamente ao antígeno de excreção-secreção de larvas *newborn* (AgESLNB), ele foi o que apresentou menor reactividade para todos os anticorpos determinados pelo método de ELISA.

Contudo, ao contrário do observado para a IgG, na detecção dos anticorpos IgM e IgG₁ verificaram-se reacções cruzadas na presença de infecção por *Toxocara canis* com os quatro antígenos produzidos.

O reconhecimento de anticorpos induzidos por outros helmintas, tais como *Capillaria*, *Trichuris*, *Schistosoma mansoni* e *Fasciola hepatica*, tem sido observado em infecções por

Trichinella spp. tanto em humanos como em animais domésticos e selvagens (Niel *et al.*, 1976; Roach *et al.*, 1988; Linder *et al.*, 1992 e De La Rosa & Correa, 1995). Além disso, os resultados de diversos estudos demonstraram a existência de comunidades antigénicas comuns entre *Trichinella* spp. e outros helmintas (Abdel-Rahman *et al.*, 2003; Yera *et al.*, 2003 e Abdel-Rahman & Abdel-Megeed, 2005). Na opinião destes autores, este facto tem contribuído para limitar a aplicação dos métodos serológicos, em particular a técnica de ELISA, em larga escala.

Para além das características dos antígenos, outro aspecto igualmente relevante é determinado pela expressão da resposta imunológica do hospedeiro na infecção por *Trichinella* spp. No que se refere à resposta imune humoral, alguns estudos experimentais têm demonstrado uma variação nas classes das imunoglobulinas expressas no decurso da infecção, aparentemente dependentes da estirpe de *Trichinella*, da fase parasitária e da dose infectante, assim como, do hospedeiro.

Nas infecções por *T. spiralis* e *T. pseudospiralis* em modelo murino (Furze e Selkirk, 2005), a resposta imune frente a antígenos ES de larvas L1 caracterizava-se pelo aparecimento inicial de anticorpos IgA, seguindo-se a IgM e IgG. Em relação aos isótipos da IgG, os da subclasse IgG₁ foram detectados mais cedo e em níveis mais elevados do que IgG_{2a}. Embora o desenvolvimento da resposta imune tenha sido semelhante nas duas espécies, os níveis de anticorpos induzidos por *T. spiralis* eram significativamente mais elevados e consistentes durante o período de infecção.

Resultados diferentes foram obtidos por Serrano *et al.*, (2001) nas infecções por *T. spiralis* e *T. brivoti* em porcos, tendo os autores verificado uma relação directa entre os títulos de IgG e IgG₁ anti-parasita, a dose infectante e a intensidade da infecção, associação que não foi observada para IgM. Também neste estudo, os níveis séricos de anticorpos eram superiores na infecção por *T. spiralis*.

No que se refere à cinética dos anticorpos, observámos um padrão idêntico para IgG e IgM, tanto para o início da positividade (11º dia) como para a subida do título de anticorpos (“picos”), coincidentes com as fases de eclosão e enquistamento das larvas (Figura 12). Quanto à IgG₁, apesar

de terem sido detectados valores positivos ao 12º dia, a subida marcante dos níveis destes anticorpos parece ocorrer a partir do 45º dia de infecção, correspondente à fase de enquistamento (Figura 29). De acordo com Doligalska (2000) e Moskwa (1999), o aumento de IgG₁ na fase muscular será resultante da sua acção larvicida sobre as larvas imaturas, em cooperação com os mecanismos efectores de citotoxicidade mediados por anticorpos.

Na maioria das investigações referentes ao desenvolvimento da resposta imune humoral tem sido observado que os anticorpos IgG parecem ser dominantes no controlo da infecção, sendo activados precocemente e expressos durante longo período na maior parte dos hospedeiros (Mendez-Loredo *et al.*, 2001, Furze e Selkirk, 2005). Contudo, na infecção em cavalos (Pozio *et al.*, 2002b), parece haver uma sub-expressão destes anticorpos, induzindo a resultados falso-negativos. Estudos epidemiológicos recentes em pacientes assintomáticos que tiveram triquinelose demonstram uma associação directa e específica entre os níveis de IgG₄ anti-*Trichinella* e a fase crónica da parasitose, sugerindo a sua utilização como marcador imunológico da infecção, apresentando este uma alta sensibilidade e especificidade (Pinelli *et al.*, 2004 e 2007). Observações semelhantes têm sido evidenciadas noutras infecções helmínticas, nomeadamente na fasciolose, schistosomoses e nas filarioses (Silveira *et al.*, 2002; Belo e Grácio, 2003; Maizels & Yazdanbakhsh, 2003).

Na determinação da expressão destes anticorpos ao longo do período de infecção, foi evidente a dependência da preparação antigénica utilizada. Os resultados mais consistentes e expressivos observaram-se com os antigénios somáticos, enquanto que com os antigénios de excreção-secreção a infecção foi detectada mais tardiamente e com títulos de anticorpos bastante inferiores. Estas observações estão em concordância com o referido por Pozio *et al.*, (2002b) e Bién (2007), em estudos efectuados em cavalos e porcos, respectivamente. Além disso, a aplicação de antigénios somáticos no diagnóstico da triquinelose humana (Ruangkunaporn *et al.*, 1994) permitiu a sua detecção numa fase precoce a par de uma elevada sensibilidade e especificidade (81% e 92%, respectivamente), indicadores que atingiram índices de 100% após dois a quatro meses de infecção.

A análise da constituição antigénica por electroforese em gel de poliacrilamida (10% e 12,5%) revelou um padrão de fracções distinto nos quatro antígenos, salientando-se o número reduzido de bandas visualizadas nos antígenos ES em contraste com o observado nos antígenos somáticos (Figuras 33 e 34). A electroforese em SDS-PAGE do antígeno de excreção-secreção por nós produzido, a partir de larvas recém eclodidas e em migração (AgESLNB), revelou um número restrito de bandas com pesos moleculares compreendidos entre 32 e 100 KD, fracções comuns aos outros antígenos. No entanto, não foi possível testar a sua reactividade devido ao reduzido volume obtido. Segundo Salinas-Tobon *et al.*, (2007) o antígeno de LNB parece efectivamente ser constituído por um reduzido número de fracções antigénicas, comuns a outros estadios do parasita, com excepção de uma fracção imunoreactiva de 49 KD, aparentemente específica da fase de larva imatura.

Apesar do leque das fracções proteicas encontrado no nosso estudo ser muito abrangente, identificaram-se duas bandas, de 56 e 74 KD, comuns aos quatro antígenos, enquanto que outras parecem ser antígeno-específicas, nomeadamente as moléculas de 16 e 82 KD apenas detectadas no antígeno de excreção-secreção de larvas L1 (Quadro 6).

A imunoreactividade das fracções dos antígenos somáticos (AgT e AgS) para IgG e IgM foi testada por *Immunoblotting*, perante todos os soros obtidos durante a infecção experimental. No que se refere ao antígeno total (AgT), as moléculas de 42, 82, 104, 124 e 250 KD foram as reconhecidas com mais frequência pela IgG anti-parasita, enquanto que para a IgM predominaram os polipéptidos com pesos moleculares de aproximadamente 49, 56, 114, 200 e 250 KD (Figuras 38 e 39). Apenas três fracções de 49, 68 e 250 KD reagiram com as duas classes de anticorpos e, à semelhança do observado no método de ELISA na detecção da IgM, verificou-se reactividade cruzada com *T. canis* a nível das moléculas de 49 e 114 KD.

Em relação ao AgS (antígeno somático L1 pós-incubação), a detecção de IgG e IgM anti-parasita também demonstrou um padrão de reactividade diferente (Figuras 42 e 43). Com efeito, no caso da IgG, foram as fracções de 38, 98, 150 e 250 KD e, para IgM, as de 32, 42, 200 e 250 KD as

reconhecidas com mais frequência. Com excepção da molécula de 150 KD, reactiva com soro de *T. canis*, as restantes fracções antigénicas demonstraram uma elevada especificidade.

Um aspecto relevante evidenciado nos dois antígenos foi a presença constante de certas bandas ao longo do período de infecção, enquanto que determinadas fracções parecem ser específicas de fase (Quadros 9 e 11).

Comparando com os resultados de outros estudos (Pozio *et al.*, 2002b, Yera *et al.*, 2003; Pinelli *et al.*, 2007 e Salinas-Tobon *et al.*, 2007), existem algumas similaridades no padrão de reactividade de certas fracções antigénicas, em particular as de pesos moleculares compreendidos entre 32-35 KD, 43-45 KD, 49KD e 97-105KD. Além disso, a sua frequência foi observada em antígenos produzidos de diferentes fases parasitárias de *Trichinella* spp. no diagnóstico da infecção em diversos hospedeiros (incluindo humanos).

Estas observações são de elevada importância, uma vez que através de estudos mais aprofundados a nível molecular, bioquímico, etc., poderão ser desenvolvidas outras ferramentas de maior especificidade para o imunodiagnóstico, tais como proteínas recombinantes, o que permitirá o aumento da reprodutibilidade dos testes e a sua aplicação em larga escala, nomeadamente em estudos de rastreio e/ou em complemento dos métodos directos em vigor na inspecção da triquinelose. Outra vantagem adicional desta metodologia será a redução do recurso a modelos animais, para obtenção de antígenos.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, E.H., ABDEL-MEGEED, K.N. & ABUEL-EZZ, N.M., 2003. Cross-reaction: a common trait among helminthes. *J Egypt Soc Parasitol*, **33** (2): 457-471.
- ABEL RAHMAN, E.H. & ABDEL MEGEED, K.N., 2005. Cross-protection induced by cross-reactive antigen against *Fasciola gigantica* and *Trichinella spiralis* infections. *J Egypt Soc Parasitol*, **35** (1): 281-294.
- AL-SHERBINY, M.M., FARRAG, A.A., FAYAD, M.H., MAKLED, M.K., TAWFEEK, G.M. & ALI, N.M., 2004. Application and assessment of a dipstick assay in the diagnosis of hydatidosis and trichinosis. *Parasitol Res*, **93** (2): 87-95.
- APPLETON, J.A., SCHAIN, L.R. & MCGREGOR, D.D., 1988. Rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats: mediation by monoclonal antibodies. *Immunology*, **65** (3): 487-492.
- APPLETON J.A., BELL R., HOMAN W. & VAN KNAPEN F., 1991. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitol. Today*, **7**: 190-192.
- APPLETON, J.A. & ROMARIS, F., 2001. A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Vet Parasitol*, **101** (3-4): 249-260.
- AU, A.C., KO, R.C., SIMON, J.W., RIDELL, N.J., WONG, F.W. & TEMPLER, M.J., 1983. Study of acute trichinosis in Ghurkas: specificity and sensitivity of enzyme-linked immunosorbent assays for IgM and IgE antibodies to *Trichinella* larval antigens in diagnosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **77** (3): 412-415.

AZEVEDO, J.F., PALMEIRO J.M., ROMBERT P., 1974. Aspectos da triquinelose em Portugal. A propósito de caso de parasitismo no *Canis lúpus*. *An. Inst. Hig Med. trop*, **1**: 340-356.

AZEVEDO, J.F., ROMBERT P., PALMEIRO J.M., 1975. Pequeno rastreio sobre triquinelose e a leptospirose em suínos. *An. Inst. Hig Med. trop* **2**: 377-380

BANDI, C., LA ROSA G., COMINCINI S., DAMIANI, G., & POZIO E., 1993. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology* **107**: 419-424.

BANDI, C., LA ROSA G., BARDIN M. G., COMINCINI S. & TASCIOTTI L., 1995. Random amplified polymorphic DNA fingerprints of the eight taxa of *Trichinella* and their comparison with allozyme analysis. *Parasitology* **110**: 401-407.

BECK, R., GASPAR A., MIHALJEVIC Z., MARINCULIC A., STOJCEVIC, D. & BRSTILO M., 2005. Evaluation of ELISA for detection of *Trichinella* antibodies in muscle juice samples of naturally infected pigs. *Vet Parasitol*, **132**: 91-95.

BECKY, E.A., CRUZ, E.S., HANDA, K.M., WASSOM L., 1991. IFN – gamma and IL – 5 producing cells compartmentalize to different lymphoid organs in *Trichinella spiralis* infected mice. *J. Immunol*, 147:306.

BEITING, D.P., BLISS, S.K., SCHLAFFER, D.H., ROBERTS, V.L. & APPLETON, J.A., 2004. Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage *Trichinella spiralis*. *Infect Immun*, **72** (6): 3129-3137.

- BELL, R.G., 1988. The generation and expression of immunity to *Trichinella spiralis* in laboratory rodents. *Adv. Parasitol*, **41**: 149-217.
- BELO, S. & GRÁCIO, M.A.A. 2003. Immunodiagnosis of human fascioliasis by IgG₄ antibody assessment. *Acta Parasitológica Portuguesa*, **10** (1): 84-85.
- BIEN, J., 2007. The usefulness of ELISA test for early serological detection of *Trichinella* spp. infection in pigs. *Wiad Parazytol*, **53** (2): 149-151.
- BLANCOU J., 2001. History of trichinellosis surveillance. *Parasite*, **8**:16-19.
- BOCZON, K., WINIECKA, J., KOCIECKA, W., HADAS, E. & ANDRZEJEWSKI. 1981. The diagnostic value of enzymatic and immunological tests in human trichinellosis. *Tropenmed. Parasitol*, **32**: 109.
- BOIREAU, P., VAYSSIER, M., FABIEN, J.F., PERRET, C., CALAMEL, M. & SOULE, C.,1997. Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers. *Parasitology*, **115** (Pt 6): 641-651.
- BOIREAU, P., VALLEE, I., ROMAN, T., PERRET, C., MINGYUAN, L., GAMBLE, H.R. & GAJADHAR, A., 2000. *Trichinella* in horses: a low frequency infection with high human risk. *Vet Parasitol*, **93** (3-4): 309-320.
- BOLAS-FERNANDEZ, F. & WAKELIN, D., 1989. Infectivity of *Trichinella* isolates in mice is determined by host immune responsiveness. *Parasitology*, **99** (Pt 1): 83-88.

- BRUSCHI, F. & MURRELL, K.D., 2002. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad Med J*, **78** (915): 15-22.
- CAPO, V.A., DESPOMMIER, D.D. & POLVERE, R.I., 1998. *Trichinella spiralis*: vascular endothelial growth factor is up-regulated within the nurse cell during the early phase of its formation. *J Parasitol*, **84** (2): 209-214.
- COFFMAN, R.L., OHARA, J., BOND, M.W., CARTY, J., ZLOTNICK, E., PAUL, W.E., 1986. B cell stimulatory factor-I enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol*, **136**, 4538.
- COMMISSION REGULATION (EC) N° 2075/2005. Specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official J. E.U.* 338, 60–82.
- CUI, J., ZHANG, H.W., WANG, Z.Q. & LI, Y.L., 2004. Construction of DNA vaccine of *Trichinella spiralis* muscle larvae and its expression in mice. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, **22** (1): 5-8.
- CUPERLOVIC, K. DJORDJEVIC, M. PAVLOVIC, S., 2005. Re-emergence of trichinellosis in southeastern Europe due to political and economic changes. *Vet Parasitol* **132**: 159–166.
- DEA-AYUELA, M., RODERO, M., RODRIGUEZ-BUENO, R., BOLAS-FERNANDEZ, F. & MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R., 1999. Modulation by Anapsos (*Polypodium leucotomos* extract) of the antibody responses against the nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Phytother Res*, **13** (7): 566-570.

- DEA-AYUELA, M.A., ROMARIS, F., UBEIRA, F.M., RAMA-INIGUEZ, S., MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R. & BOLAS, F. 2001. Possible presence of common tyvelose-containing glycans in *Trichinella* L1 larvae and embryonated eggs of several nematodes. *Parasite*, **8**(2 Suppl): S120-122.
- DE-LA-ROSA, J.L., ALCANTARA, P. & CORREA, D., 1995. Investigation of cross-reactions against *Trichinella spiralis* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay in patients with various diseases. *Clin Diagn Lab Immunol*, **2** (1): 122-124.
- DESPOMMIER, D.D. & LACCETTI, A., 1981. *Trichinella spiralis*: proteins and antigens isolated from a large-particle fraction derived from the muscle larva. *Exp Parasitol*, **51** (2): 279-295.
- DESPOMMIER, D.D., 1983 Biology. In *Trichinella* and Trichinosis. Campbell W. C. (ed) *Plenum Press New York and London*. pp.75-151.
- DESPOMMIER, D.D., 1998. How Does *Trichinella spiralis* Make Itself at Home? *Parasitol Today*, **14** (8): 318-323.
- DESPOMMIER, D.D., SYMMANS, W.F. & DELL, R., 1991. Changes in nurse cell nuclei during synchronous infection with *Trichinella spiralis*. *J Parasitol*, **77** (2): 290-295.
- DICK, T.A., 1983. Infectivity of isolates of *Trichinella* and the ability of an arctic isolate to survive freezing temperatures in the raccoon, *Procyon lotor*, under experimental conditions. *J Wildl Dis*, **19** (4): 333-336.

- DICK, T.A. & BELOSEVIC, M. 1978. Observations on a *Trichinella spiralis* isolate from a polar bear. *J Parasitol*, **64** (6): 1143-1145.
- DOLIGALSKA, M. 2000. Immune response to *Trichinella spiralis* larvae after treatment with the anti-allergic compound ketotifen. *Parasitol Res*, **86** (3): 232-238.
- DUPOY-CAMET J., 2000. Trichinellosis: A worldwide zoonosis. *Vet. Parasitol.* **93**:191-200.
- DUPOUY-CAMET, J., BOUGNOUX, M.E., ANCELLE, T., FAGARD, R. & LAPIERRE, J., 1988. Antigenic characteristics of two strains of *Trichinella spiralis* isolated during the horsemeat-related outbreaks of 1985 in France. *Parasitol Res*, **75** (1): 79-80.
- DUPOY-CAMET J., KOCIECKA, W., BRUSCHI, F., BOLAS-FERNANDEZ F., POZIO, E., 2002. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, **3**: 1117-1130.
- ERIKSEN, L., 1982 experimental induced resistance to *Ascaris suum* in pigs. *Nordic Veterinary Medicine*, **34**: 177-187.
- EUROPEAN COMMISSION. 2001. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on trichinellosis, epidemiology, methods of detection and *Trichinella*-free pig production. Brussels.
- FELDMEIER, H., FISCHER, H. & BLAUMEISER, G., 1987. Kinetics of humoral response during the acute and the convalescent phase of human trichinosis. *Zbl. Bakt. Hyg.* **264**: 221.

FLISSER, A., VELASCO-VILLA, A., MARTINEZ-CAMPOS, C., GONZALEZ-DOMINGUEZ, F., BRISENO-GARCIA, B., GARCIA-SUAREZ, R., CABALLERO-SERVIN, A., HERNANDEZ-MONROY, I., GARCIA-LOZANO, H., GUTIERREZ-COGCO, L., RODRIGUEZ-ANGELES, G., LOPEZ-MARTINEZ, I., GALINDO-VIRGEN, S., VAZQUEZ-CAMPUZANO, R., BALANDRANO-CAMPOS, S., GUZMAN-BRACHO, C., OLIVO-DIAZ, A., DE LA ROSA, J., MAGOS, C., ESCOBAR-GUTIERREZ, A. & CORREA, D., 2002. Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. *Arch Med Res*, **33** (4): 343-350.

FORBES, L. B., 2000. The occurrence and ecology of *Trichinella* in marine mammals. *Vet. Parasitol.* **93**: 321-334.

FORBES, L.B., APPLEYARD G.D. & GAJADHAR A.A., 2004. Comparison of synthetic tyvelose antigen with excretory-secretory antigen for detection of trichinelosis in swine using enzyme linked immunosorbent assay. *J. Food Prot*, **90**: 835-840.

FURZE, R.C. & SELKIRK, M.E., 2005. Comparative dynamics and phenotype of the murine immune response to *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Parasite Immunol*, **27**(5): 181-188.

GAMBLE, H.R., 1996. Detection of trichinelosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J. Food Prot*, **59**: 295-298.

GAMBLE, H.R., RAPIC, D., MARINCULIC, A. & MURRELL, K.D., 1988. Evaluation of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of swine trichinellosis. *Vet Parasitol*, **30** (2): 131-137.

- GAMBLE, H.R., WISNEWSKI, N. & WASSON, D.L., 1997. Diagnosis of trichinellosis in swine by enzyme immunoassay, using a synthetic glycan antigen. *Am J Vet Res*, **58** (12): 1417-1421.
- GAMBLE, H.R., BESSONOV, A.S., CUPERLOVIC, K., GAJADHAR, A.A, KNAPEN, F., VAN, 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. *Vet. Parasitol*, **93**:393-408.
- GAMBLE, H.R., POZIO, E., BRUSCHI F., NOCKLER K., KAPEL C.M. & GAJADHAR A.A., 2004. International commission on trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite*, **11**: 3-13.
- GAUSE, W.C., URBAN, JR., J.F., STADECKER, M.J., 2003. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *TRENDS in Immunology*, **24** (5): 269-277.
- GEERTS, S., DE BORCHGRAVE J., DORNY, P. & BRANDT, J., 2002. Trichinelosis: Old facts and new developments. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg*, **64**: 233-250.
- GOLVAN, Y.J. & AMBROISE-THOMAS, P., 1984. Les Nouvelles Techniques en Parasitologie 1^a Ed. *Flammarion Médecine-Sciences* France, p 298.
- GOULD, S. E., 1970. Trichinosis in man e animals. Gould S. E., (ed.) Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, USA. p 540.
- GOYAL, P.K., WHEATCROFT, J. & WAKELIN, D., 2002. Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Int*, **51** (1): 91-98.

GRÁCIO, M.A.A. POIARES DA SILVA, J., FONSECA, C., TRINCA A., GUIMARÃES H., OLIVEIRA E SILVA, H., SOUSA M.C., 2003. Contribuição para o estudo da triquinelose em Portugal: Inquérito epidemiológico em javalis (*Sus scrofa L.*) nas Beiras litoral e Interior. *Acta Paras. Port.* **10** (1):1-13

GUIMARÃES, M.C.S., 1984. Coleta de sangue em papel de filtro para fins de inquéritos seroepidemiológicos. *Rev. Soc. Brasileira de Med. Trop.*, **17**: 17-45.

GUTIERREZ-COGCO, L., RODRIGUEZ-ANGELES, G., LOPEZ-MARTINEZ, I., GALINDO-VIRGEN, S., VAZQUEZ-CAMPUZANO, R., BALANDRANO-CAMPOS, S., GUZMAN-BRACHO, C., OLIVO-DIAZ, A., LA ROSA, J., MAGOS, C., ESCOBAR-GUTIERREZ, A. & CORREA, D., 2002. Infectious diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. *Arch Med Res*, **33** (4): 343-350.

HARALABADIS, S.T., FRYDAS S.I. & HIMONAS C.A. 1989. Latex agglutination test for detecting *Trichinella spiralis* infections in pigs using muscle extract. *Vet. Parasitol*, **34**: 191-201.

INABA, T., SATO H. & KAMIYA H., 2003. Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology*, **126**:591-598.

JACKSON-GEHAN M. & JAMES E.R., 1988. Cryopreservation of *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **38**: 558-567.

KAPEL, C.M., HENRIKSEN, S.A., DIETZ, H.H., HENRIKSEN, P. & NANSEN, P., 1994. A study on the predilection sites of *Trichinella spiralis* muscle larvae in experimentally infected foxes (*Alopex lagopus*, *Vulpes vulpes*). *Acta Vet Scand*, **35** (2): 125-132.

KAPEL, C.M., HENRIKSEN S.A., BERG, T.B. & NANSEN P., 1995. *Trichinella* infections in arctic foxes from Greenland: Studies and reflections on predilection sites of muscle larvae. *J. Helminthol*, **69**: 325-330.

KAPEL, C.M., WEBSTER P., BJORN H., MURRELL K. D. & NANSEN P., 1998a. Evaluation of the infectivity of *Trichinella* spp. For reptiles (*Caiman sclerops*). *Int. J. Parasitol*, **28**: 1935-1937.

KAPEL, C.M., WEBSTER, P., LIND, P., POZIO, E., HENRIKSEN, S.A., MURRELL, K.D. & NANSEN, P., 1998b. *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. nativa*: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection of pigs. *Parasitol Res*, **84** (4): 264-271.

KAPEL, C.M., POZIO E., SACCHI & PRESTRUD P., 1999. Freeze tolerance, morphology, and RAPD-PCR identification of *Trichinella nativa* in naturally infected arctic foxes. *J Parasitol.*, **85**: 144-147.

KAPEL, C.M. & GAMBLE, H.R., 2000. Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int J Parasitol*, **30** (2): 215-221.

KIM, C.W., 1983 In *Trichinella and Trichinosis* (Campbell, W.C., ed.), pp 445–500, *Plenum Press*.

KJOS-HANSEN, B., 1984. *Trichinella* isolates from polar bears in Svalbard. Freeze resistance and infectivity in rats and swine. *Nord Vet Med*, **36** (1-2): 57-61.

KOCIECKA, W., 2000. Human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol*, **93**: 365-383.

- KORINKOVA, K., KOVARCIK, K., PAVLICKOVA, Z., SVOBODA, M. & KOUDELA, B., 2008. Serological detection of *Trichinella spiralis* in swine by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) using an excretory-secretory (E/S) antigen. *Parasitol Res*, **102** (6): 1317-1320.
- LA ROSA, G., MARUCCI, G. & POZIO, E., 2003. Biochemical analysis of encapsulated and non-encapsulated species of *Trichinella* (Nematoda, Trichinellidae) from cold- and warm-blooded animals reveals a high genetic divergence in the genus. *Parasitol Res*, **91**(6): 462-466.
- LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- LI, C.K. & KO, R.C., 2001. The detection and occurrence of circulating antigens of *Trichinella spiralis* during worm development. *Parasitol Res*, **87** (2): 155-162.
- LICHTENFELS, J.R., MURRELL, K.D. & PILITT, P.A., 1983. Comparison of three subspecies of *Trichinella spiralis* by scanning electron microscopy. *J Parasitol*, **69** (6): 1131-1140.
- LINDER, E., THORS, C., LUNDIN, L., LJUNGSTROM, I., FARAH, S., HAGI, H. & DIAS, F., 1992. Schistosome antigen gp50 is responsible for serological cross-reactivity with *Trichinella spiralis*. *J Parasitol*, **78** (6): 999-1005.
- LIU, M. & BOIREAU, P. 2002., Trichinellosis in China: epidemiology and control. *Trends Parasitol*, **18** (12): 553-556.

- LJUNGSTROM, I., 1974. Antibody response to *Trichinella spiralis*. In Trichinellosis; Proc. 3rd Intern. Conf. Trichinellosis (ed. by C.W.Kim) Intext Educational, New York, p. 449.
- LJUNGSTROM, I., HAMMARSTROM, L., KOCIECKA, W. & SMITH, C.I., 1988. The sequential appearance of IgG subclasses and IgE during the course of *Trichinella spiralis* infection. *Clin Exp Immunol*, **74** (2): 230-235.
- MAGALHÃES, A.S.T, NUNES, T. BRUNO DE SOUSA, C., SERRANO, F.J., POZIO, E., CATANHO, H., PEREIRA DA FONSECA, I.M., AFONSO ROQUE, M.M., MEIRELES, J.A., FAZENDEIRO, M.I., MADEIRA DE CARVALHO, L.M., 2004. Triquinelose silvática em Portugal continental. *Rev. Port. Cien. Vet.* **126**: 24-25.
- MAIZELS, R.M., PHILIPP M. & OGILVIE B.M., 1982. Molecules on de the surface of parasitic nematodes as probes of immune response in infection. *Immunol. Rev.* **61**: 109-136.
- MAIZELS, R.M & YAZDANBAKHS, M., 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol* **3**:733-744.
- MALAKAUSKAS, A., KAPEL, C.M. & WEBSTER, P., 2001. Infectivity, persistence and serological response of nine *Trichinella* genotypes in rats. *Parasite*, **8** (2): 216-222.
- MARTI, H.P. & MURRELL, K.D., 1986. *Trichinella spiralis*: antifecundity and antinewborn larvae immunity in swine. *Exp Parasitol*, **62** (3): 370-375.

- MENDEZ-LOREDO, B., MARTINEZ Y ZAMORA, R., CHAPA-RUIZ, R. & SALINAS-TOBON, R. 2001. Class specific antibody responses to newborn larva antigens during *Trichinella spiralis* human infection. *Parasite*, **8** (2 Suppl): S152-157.
- MCGUIRE, C., CHAN, W.C. & WAKELIN, D., 2002. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. *Infect Immun*, **70** (12): 7149-7152.
- MOLLER, L.N., PETERSEN, E., GAMBLE, H.R. & KAPEL, C.M., 2005. Comparison of two antigens for demonstration of *Trichinella spp.* antibodies in blood and muscle fluid of foxes, pigs and wild boars. *Vet Parasitol*, **132** (1-2): 81-84.
- MORETTI A., FIORETTI D. P., PASQUALI P., MECHELLI L., ROSSODIVITA M. E. & POLIDORI G. A., 1997. Experimental infection of fish with *Trichinella brivoti*: Biological evaluations. In: *Trichinellosis*. Proceedings of Ninth International Conference on Trichinellosis 1996. Ortega-Pierres G., Gamble H.R., van Knapen F. & Wakelin D. (eds). Centro de Investigacion y Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional México. pp.135-142.
- MOSKWA, B. 1999. *Trichinella spiralis*: in vitro cytotoxicity of peritoneal cells against synchronous newborn larvae of different age. *Parasitol Res*, **85** (1): 59-63.
- MULCAHY, G., O'NEILL, S., DONNELLY S., & DALTON, J.P., 2004. Helminths at mucosal barriers-interaction with the immune system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56** (6):853-868

- MURRELL, K.D., ANDERSON, W.R., SCHAD, G.A., HANBURY, R.D., KAZACOS, K.R., GAMBLE, H.R. & BROWN, J., 1986. Field evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for swine trichinosis: efficacy of the excretory-secretory antigen. *Am J Vet Res*, **47** (5): 1046-1049.
- MURRELL, K.D., LICHTENFELS, R.J., ZARLENGA, D.S. & POZIO, E., 2000. The systematics of the genus *Trichinella* with a key to species. *Vet Parasitol*, **93** (3-4): 293-307.
- NEGRAO-CORREA, D., 2001. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **43** (5): 291-299.
- NIEL, G., RICHARD-LENOBLE, D. & GENTILINI, M., 1976. Deux aspects particuliers du marquage fluorescent sur coupes a congelation de *Schistosoma mansoni* au cours des trichinoses et des bilharzioses. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, **69**:151–156.
- NOCKLER, K., POZIO, E. VOIGT, W.P, HEIDRICH, J., 2000. Detection of animal in food animals. *Vet Parasitol*, **93**: 335-350.
- OIVANEN, L., KAPEL, C.M., POZIO, E., LA ROSA, G., MIKKONEN, T. & SUKURA, A., 2002. Associations between *Trichinella* species and host species in Finland. *J Parasitol*, **88** (1): 84-88.
- ORTEGA-PIERRES, M.G., YEPEZ-MULIA, L., HOMAN, W., GAMBLE, H.R., LIM, P.L., TAKAHASHI, Y., WASSOM, D.I. & APPLETON, J.A., 1996. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol*, **18** (6): 273-284.

- PAUL, W.E., & OHARA, J., 1987. B-cell stimulatory factor-1/Interleukin4. *Ann. Rev. Immunol.* **5**: 429.
- PINELLI, E., MOMMERS, M., HOMAN, W., VAN MAANEN, T. & KORTBEEK, L.M. 2004. Imported human trichinellosis: sequential IgG4 antibody response to *Trichinella spiralis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **23** (1): 57-60.
- PINELLI, E., MOMMERS, M., KORTBEEK, L.M., CASTAGNA, B., PIERGILI-FIORETTI, D. & BRUSCHI, F., 2007. Specific IgG4 response directed against the 45-kDa glycoprotein in trichinellosis: a re-evaluation of patients 15 years after infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **26** (9): 641-645.
- POLVERE, R.I., KABBASH, C.A., CAPO, V.A., KADAN, I. & DESPOMMIER, D.D., 1997. *Trichinella spiralis*: synthesis of type IV and type VI collagen during nurse cell formation. *Exp Parasitol*, **86** (3): 191-199.
- POZIO, E., 1998. Trichinellosis in the European union: epidemiology, ecology and economic impact. *Parasitol Today*, **14** (1): 35-38.
- POZIO, E., 2000. Factors affecting the flow among domestic, synanthropic and sylvatic cycles of *Trichinella*. *Vet Parasitol*, **93** (3-4): 241-262.
- POZIO, E., 2001. New patterns of *Trichinella* infection. *Vet Parasitol*, **98** (1-3): 133-148.
- POZIO, E., 2005. The broad spectrum of *Trichinella* host: From cold-to warm-blooded animals. *Vet Parasitol*, **132**: 3-11.

- POZIO, E., 2007. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Vet Parasitol*, **149** (1-2): 3-21.
- POZIO, E., LA ROSA, G., MURRELL, K.D. & LICHTENFELS, J.R., 1992a. Taxonomic revision of genus *Trichinella*. *J. Parasitol*, **78** (4): 654-659.
- POZIO, E., LA ROSA G., ROSSI P. & MURRELL K. D., 1992b. Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J. Parasitol*, **78**: 647-653.
- POZIO, E., VARESE, P., MORALES, M.A., CROPPO, G.P., PELLICCIA, D. & BRUSCHI, F., 1993. Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by *Trichinella britovi*. *Am J Trop Med Hyg*, **48** (4): 568-575.
- POZIO, E., LA ROSA, G., SERRANO, F.J., BARRAT, J. & ROSSI, L., 1996. Environmental and human influence on the ecology of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Western Europe. *Parasitology*, **113** (Pt 6): 527-533.
- POZIO, E., OWEN I. L., LA ROSA G., SACCHI L., ROSSI P. & CORONA S., 1999. *Trichinella papuae* n. sp. (nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. *Int. J. Parasitol*, **29**:1825-1839.
- POZIO, E. & LA ROSA, G., 2000. *Trichinella murrelli* n. sp: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *J Parasitol*, **86** (1): 134-139.

- POZIO, E., FOGGIN, C. M., MARUCCI G., LA ROSA, G., SACCHI, L. & CORONA S., 2002a. *Trichinella zimbabwensis* n.sp. (nematoda), a new non encapsulated species from crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe also infecting mammals. *Int. J. Parasitol*, **32**: 1787-1799.
- POZIO, E., SOFRONIC-MILOSAVLJEVIC, L., GOMEZ MORALES, M.A., BOIREAU, P. & NOCKLER, K., 2002b. Evaluation of ELISA and Western Blot Analysis using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Vet Parasitol*, **108** (2): 163-178.
- POZIO, E. & MARUCCI, G., 2003. *Trichinella*-infected pork products: a dangerous gift. *Trends Parasito*, 19, 338.
- POZIO, E., MARUCCI, G., CASULLI, A., SACCHI, L., MUKARATIRWA, S., FOGGIN, C.M. & LA ROSA, G., 2004. *Trichinella papuae* and *Trichinella zimbabwensis* induce infection in experimentally infected varans, caimans, pythons and turtles. *Parasitology*, **128** (Pt 3): 333-342.
- POZIO, E. & MURRELL, K.D., 2006. Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Advances in Parasitology*, **63**:367-439.
- REY, L., 2001. Parasitologia, 3ª Ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p: 617.
- RIBICICH, M., MIGUEZ, M, FRANCO A, BASSO N, GAMBLE, H.R, SANTILLAN G, MOLINA V, GUARNERA E., 2000. Evaluation of ELISA test for the diagnosis of porcine trichinellosis, *Pig J* 46:24-34.
- RIBICICH, M., GAMBLE, H.R., ROSA, A., BOLPE, J. & FRANCO, A. 2005. Trichinellosis in Argentina: an historical review. *Vet Parasitol*, **132** (1-2): 137-142.

- ROACH, T.I., WAKELIN, D., ELSE, K.J. & BUNDY, D.A., 1988. Antigenic cross-reactivity between the human whipworm, *Trichuris trichiura*, and the mouse trichuroids *Trichuris muris* and *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol*, **10** (3): 279-291.
- ROBERT, F., WEIL, B., KASSIS, N. & DUPOUY-CAMET, J. 1996. Investigation of immunofluorescence cross-reactions against *Trichinella spiralis* by western blot (immunoblot) analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **3** (5): 575-577.
- RODRIGUEZ DE LAS PARRAS, E., RODRIGUEZ-FERRER, M., NIETO-MARTINEZ, J., UBEIRA, F.M. & GARATE-ORMAECHEA, T. 2004. [Trichinellosis outbreaks in Spain (1990-2001)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **22** (2): 70-76.
- RODRIGUEZ-OSORIO, M., ABAD, J.M., DE HARO, T., VILLA-REAL, R. & GOMEZ-GARCIA, V. 1999. Human trichinellosis in Sourthern Spain: serologic and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg*, **61** (5): 834-837.
- RUANGKUNAPORN, Y., WATT, G., KARNASUTA, C., JONGSAKUL, K., MAHANNOP, P., CHONGSA-NGUAN, M. & CHAICUMPA, W., 1994. Immunodiagnosis of trichinellosis: efficacy of somatic antigen in early detection of human trichinellosis. *Asian Pac J Allergy Immunol*, **12**(1): 39-42.
- SALINAS-TOBON MDEL, R., NAVARRETE-LEON, A., MENDEZ-LOREDO, B.E., ESQUIVEL-AGUIRRE, D., MARTINEZ-ABRAJAN, D.M. & HERNANDEZ-SANCHEZ, J., 2007. *Trichinella spiralis*: strong antibody response to a 49 kDa newborn larva antigen in infected rats. *Exp Parasitol*, **115** (2): 160-167.

- SERRANO, F.J., PEREZ-MARTIN, J.E., CARRON, A. & NAVARRETE, I., 2001. Comparison of IgM, IgG₁ and IgG₂ responses to *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in swine. *Parasite*, **8** (2 Suppl): S133-135.
- SIDERAS, P., BERGSTEDT-LINDQVIST, S., MACDONALD, H.R. & SEVERINSON, E. 1985. Secretion of IgG₁ induction factor by T cell clones and hybridomas. *Eur. J. Immunol*, **15**: 586.
- SILBERSTEIN, D.S. & DESPOMMIER, D.D. 1984. Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *J Immunol*, **132** (2): 898-904.
- SILVEIRA, AM., BETHONY, J GAZZINELLI, A., KLOOS, H., FRAGA LA., ALVARES, MC., PRATA., A, GUERRA, HL., LOVERDE, PT., CORREA-OLIVEIRA, R., GAZZINELLI, G., 2002. High levels of IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigens in individuals with periportal fibrosis. *AM J Trop Med Hyg.*, **66** (5): 542-549.
- SLOTVED, H.C., ROEPSTORRFF, A., BARNES, E.H., ERIKSEN, L., NANSEN, P. 1996. Comparison of two methods for recovering migrating *Ascaris suum* larvae from the liver and lungs of pigs. *J. Parasitol.*, **82** (4): 615-621.
- SOTIRAKI, S.T., ATHANASIOU, L.V., HIMONAS, C.A., KONTOS, V.J. & KYRIOPOULOS, I., 2001. Trichinellosis in Greece: a review. *Parasite*, **8** (2): 83-85.
- SOULSBY, E. J. L., 1982. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. 7th ed, London Bailliere Tindall. pp. 329-333.

- SOUSA, C.B., MAGALHÃES A., GAJADHAR, A., MADEIRA DE CARVALHO, L.M., AFONSO-ROQUE, M.M., 2003. Helmintoses de ungulados silvestres do perímetro florestal da Contenda (Portugal). *Acta Paras. Port*, **10** (1):26.
- SRETER, T., SZELL, Z. & VARGA, I., 2005. Current knowledge on human trichinellosis. *Orv Hetil*, **146** (3): 117-125.
- STEWART, G.L., FISHER, F.M., JR., RIBELLES, E., CHIAPETTA, V. & LABRUM, R., 1978. *Trichinella spiralis*: alterations of blood chemistry in the mouse. *Exp Parasitol*, **45** (2): 287-297.
- SUKHDEO, M.V., 1991. The relationship between intestinal location and fecundity in adult *Trichinella spiralis*. *Int J Parasitol*, **21** (7): 855-858.
- SUKURA, A., NAREAHO, A., VEIJALAINEN, P. & OIVANEN, L., 2001. Trichinellosis in farmed wild boar: meat inspection findings and seroprevalence. *Parasite*, **8** (2): 243-245.
- TAKAHASHI, Y., UNO, T., MIZUNO, N., SUZUKI, H., WADA, T. & ARAKI, T., 1990. Immunocytochemical evaluation of *Trichinella spiralis* larval antigen. *J Electron Microsc (Tokyo)*, **39** (3): 155-159.
- TAKAHASHI, Y., MIZUNO, N., ARAKI, T., OKUDA, H. & NAKASHIMA, T., 1994. Immunocytochemical localization of antigens in adult worms of *Trichinella spiralis* recognized by Fischer rats. *Parasitol Res*, **80** (4): 291-296.
- TAKAHASHI, Y., MINGYUAN, L. & WAIKAGUL, J., 2000. Epidemiology of trichinellosis in Asia and the Pacific Rim. *Vet Parasitol*, **93** (3-4): 227-239

- THEODOROPOULOS, G., KAPEL C. M., WEBSTER P., SARAVANOS L., ZAKI J. & KOUTSOTOLIS K., 2000. Infectivity, predilection sites, and freeze tolerance of *Trichinella spp.* in experimentally infected sheep. *Parasitol. Res*, 86:401-405.
- TORRENTS, D. & VERGARA, P., 2000. In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **279** (3): 543-551.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J., 1979. Electrophoretic Transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sciences, USA*, **76**: 4350-4354.
- VAN DER LEEK, M.L., DAME, J.B. & LITTELL, R.C., 1992. Minimizing ELISA background in the diagnosis of swine trichinellosis. *J Parasitol*, **78** (5): 822-829.
- VAN KNAPEN, F., FRANCHIMONT, J.H., VERDONK, A.R., STUMPF, J., UNDEUTSCH, K., 1982. Detection of specific immunoglobulins (IgG, IgM, IgA, IgE) and total IgE levels in human trichinosis by means of the enzyme-linked immunosorbent assay, *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **31**: 973.
- VIEIRA, R. A., 1983. Trichinellosis infection in Portugal, *Wiad. Parazyto.*, **29**: 627–633.
- VITETTA, E.S., BROOKS, K., CHEN, Y.W., ISAKSON, P., JONES, S., LAYTON, J., MISHRA, G.C., PURE, E., WEISS, E., WORD, C., YUAN, D., TUCKER, P., UHR, J.W. & KRAMMER, P.H. 1984. T cell-derived lymphokines that induce IgM and IgG secretion in activated murine B cells. *Immunol. Rev*, **78**: 137.

- VITETTA, E.S., OHARA, J., MYERS, C., LAYTON, J., KRAMMER P.H., PAUL, W.E., 1985. Serological biochemical, and functional identity of B cell stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J. exp. Med*, **162**: 1726.
- VOLLER, A., 1976. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **70** (2): 98-106.
- WAKELIN, D., 1996. Immunology and genetics of zoonotic infections involving parasites. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **19** (4): 255-265.
- WAKELIN, D. & DENHAM D., 1983. The Immune Response. In *Trichinella* and Trichinosis. Campbell, W.C. (ed.) *Plenum Press*, New York, pp. 255-265.
- WAKELIN D. & GOYAL P.K., 1996. *Trichinella* isolates: Parasite variability and host responses. *Int. J. Parasitol*, **26**: 471-481.
- WANG, Z.Q., HAN, H.M. & CUI, J., 2005. Preliminary study on congenital transmission of *Trichinella spiralis* in mice. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, **23** (2): 73-77.
- WATANABE, N., BRUSCHI, F. & KORENAGA, M., 2005. IgE: a question of protective immunity in *Trichinella spiralis* infection. *Trends Parasitol*, **21** (4): 175-178.
- WU, Z., NAGANO, I., BOONMARS, T. & TAKAHASHI, Y., 2005. Tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis in *Trichinella spiralis* infected muscle cells. *Parasitology*, **131** (Pt 3): 373-381.

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. *Clin Diagn Lab Immunol*, **10** (5): 793-796.

ZARLENGA, D.S., CHUTE, M.B., MARTIN, A., KAPEL, M.O., 1999. A single multiplex PCR for unequivocal differentiation of six distinct genotypes of *Trichinella* and three geographical genotypes of *Trichinella pseudospiralis*. *Int. J.Parasitol*, **29**: 1859-1867.

ZARLENGA D.S., CHUTE M.B., MARTIN A. & KAPEL C.M., 2001. A single, multiplex-PCR for differentiating all species of *Trichinella*. *Parasite*, **8**: 24-26.

ZARLENGA, D.S., LA ROSA, G., POZIO, E., ROSENTHAL, B., 2004. Identification and classification within the genus *Trichinella*, with special emphasis on non-encapsulated species. *Vet. Parasitol.* **125**:75-78.

Sites da Internet:

<http://www.wormbook.org/> (Biology and genome of *Trichinella spiralis* : 1. Introduction)

<http://www.eurosurveillance.org/> (Journal about infectious diseases surveillance prevention and control in Europe)

<http://www.med.unipi.it/ict/welcome.htm> (International Commission on Trichinellosis)

<http://www.iss.it/site/Trichinella/index.asp> (International *Trichinella* Reference Center)

http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00013.htm- (OIE): Office International des Epizooties

<http://www.k-state.edu/parasitology/> (Parasitology Research)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/> (The NCBI Taxonomy Homepage)

<http://www.Trichinella.org/> (The *Trichinella* page)