INVESTIGACIÓN DE *Triquinella* spp. EN ZORROS DE CATALUNYA

Fàbregas i Comadran, X.[1], Colomer Giner, A., Alemany i Capella, A., Vila Puigdevall, C., Nogal, J.J., Bolás-Fernández, F. y López Claessens, S.
[1]Vidal i Graners, 28, 1r 2a, 08173- Sant Cugat del Vallès. xfabregues@hotmail.com

INTRODUCCIÓN.

En Europa, la triquinosis ha sido descrita en las pasadas décadas como una zoonosis emergente y/o reemergente, con 779 casos humanos confirmados en los estados miembros en 2007, de los cuales 29 lo fueron en España (EFSA, 2009). En el último decenio, los brotes humanos por consumo de carnes de caza se están dando en países como Francia, cuando se han utilizado valores de temperatura/tiempo en la congelación (Gari-Toussaint et al., 2005) y en la cocción (Ranque et al., 2000), que no destruyen el parásito. Las especies *Trichinella britovi*, *Trichinella nativa* y *Trichinella genotipo T6* han demostrado resistencia a la congelación en carnes de caza (EFSA, 2009).
En los países mediterráneos, el zorro, carnívoro oportunista, es el reservorio primario en el ciclo silvestre (Pozio et al., 1996; 1998; 2009). En Europa, por razones medioambientales, es también la especie diana de las investigaciones epidemiológicas sobre *Trichinella* spp. (Balestrieri et al., 2007). El estudio de *Trichinella* spp. en esta especie, puede compensar las escasas declaraciones oficiales de jabalíes con triquina que notifican los veterinarios clínicos. Sin embargo, sería interesante establecer la relación epidemiológica existente entre zorros y jabalies como reservorios de *Trichinella* spp., a fin de comprobar si el zorro puede ser un buen indicador de la triquinellosis en jabalí, principal vía de transmisión al hombre desde el ciclo silvestre.
El Reglamento 2075/2005 regula el control oficial de la presencia de triquinas en las carnes de consumo. En la investigación de triquinas, la fiabilidad en la detección depende del músculo de elección en la especie animal diana, del peso de la muestra de carne, del grado de infestación (larvas por gramo / LPG) y del método de investigación empleado (Fàbregas y de Benito, 2001).
El objetivo de este trabajo es localizar y caracterizar muestras positivas a *Trichinella* spp. mediante el proceso siguiente: 1. Detectar el mayor número posible de larvas/quistes de *Trichinella* spp. en muestras musculares de zorro, con el método de digestión y con el examen triquinoscópico en placas de compresión, para conocer la prevalencia de la infestación. En los procedimientos se tendrán en cuenta las especificaciones descritas en el reglamento citado y las limitaciones impuestas por los pesos de las muestras obtenidas. 2. Cuantificar el grado de infestación de las muestras positivas. 3. Determinar los municipios y las comarcas de procedencia de las muestra positivas, para elaborar un mapa epidemiológico de las especies de *Trichinella* spp. en Catalunya. 4. Identificar taxonómicamente las especies de *Trichinella* spp. localizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Las 286 muestras congeladas a –18º C, de músculo tibial anterior (*musculus tibialis anterior*) de zorro (*Vulpes vulpes*), proceden del programa de control de predadores en cotos de caza de Catalunya. Son muestras recogidas en el período 2002-2006. Este músculo es, entre otros, de elección para la detección de *Trichinella* spp. en zorros (Kapel et al., 2005). Las muestras están identificadas individualmente y correlacionadas con los principales datos biológicos (sexo, edad aproximada, estado de carnes y lesiones) y geográficos (municipio, comarca y fecha de captura y de necropsia) de los animales de procedencia, en un archivo Excel. Otro material utilizado: carne de cerdo comercial (negativa a triquinosis) para completar el peso total de muestra (100 gramos (g) de carne) en las digestiones, si fuera necesario; fichas de control de las triquinoscopias y de las digestiones; nevera isotérmica para el transporte de muestras, congelador (-18º C) y equipo informático.
En la detección de triquinas participan 2 equipos: el A, formado por 3 veterinarios (de los cuales sólo 2 son examinadores de preparaciones) que pueden o no trabajar en colaboración, y el B, formado por un sólo veterinario. Todos ellos poseen experiencia acreditada en la detección de triquinas y han sido entrenados conjuntamente.

Las muestras se pesan con una balanza de precisión SARTORIUS ED 224S para conocer su peso neto, clasificarlas según este criterio (menor de 3 g, 3-5 g, 5-8 g y mayor de 8 g) y distribuirlas según la comarca de origen. El instrumental, los reactivos utilizados y los procedimientos seguidos están reseñados en el capítulo I: Método de detección de referencia (Método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético) y en el capítulo III: Examen triquinoscópico, del anexo I: Métodos de detección y en el anexo III: Examen de animales distintos de los porcinos, del Reglamento (CE) nº 2075/2005. El equipo A utiliza un triquinoscopio de proyección marca OPTIC'S PEDRET de 60 aumentos (formato televisión) y el B, el modelo GT2000A de la misma marca, de 60x y 100x.

Para optimizar los resultados, la metodología que se sigue es: 1.1. Digestión inicial de hasta 20x5 g, de las muestras de más de 5 g. 1.2. En caso de detección de positivos en la visualización, identificación individual del positivo por triquinoscopía en placas de compresión, con el resto de la muestra. 2.1. Con las muestras de menos de 5 g, la detección individual se hace directamente por triquinoscopía de placas. 2.2. Se lleva a cabo un retrocontrol final por digestión de estas últimas muestras con resultado negativo, con la carne reciclada de las placas, si es necesario, y se conserva, en lo posible, un resto de carne para la técnica molecular.

De los positivos identificados individualmente, se envía muestra en fresco para la identificación molecular de la especie implicada por la técnica ISSR-PCR (Manzano-Lorenzo et al., 2008), al laboratorio de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existían dos antecedentes: un positivo en Argençola y otro en Llés (la Cerdanya). En este estudio no se han analizado muestras de esta comarca. Los resultados obtenidos y los parámetros técnicos de la investigación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. *Datos de las muestras positivas y parámetros técnicos de la investigación.*

	EQUIPO A	EQUIPO B	
Zorros (n)		286	
Veterinarios (n)	1-3	1	
Municipio (Comarca/Com.)	Argençola (Anoia)	Tremp (Pallars Jussà)	
Altitud (m)	700	468	
Com. muestreadas/total Com. (n/n)	22/41	11/41	
Muestras + Com./total muestras Com. (n/n)	1/9	2/4	
Sexo (n)	1 hembra	2 hembras	
Edad (años)	6	3	
Estado de carnes	bueno	normal	
Lesiones	no	ectoparásitos	
Fecha captura	mayo 2002		
Densidad comarcal zorros (n/km^2)		0,29	
LPG compresión	21	23	
LPG (cámara contaje)		20	15
Quistes/fragmentos + placa 1 (n/n)	23/15 = 1,5		
Quistes/fragmentos + placa 2 (n/n)	21/15 = 1,4		
Quistes/fragmentos + placa 3 (n/n)	19/13 = 1,5		
ISSR-PCR		*T. britovi*	*T. britovi*
Preparación muestras (horas/h)	10		
Investigación (h)	90	70	
Digestión + visualización (n)	15	10	
Triquinoscopía compresión (n)	44	81	
Placas examinadas (n)	132	243	
Tiempo examen/placa (minutos)	8		
Coste material fungible: 2 euros/digestión			

La prevalencia hallada es del 1,05%, inferior a las halladas por otros autores en Extremadura, 3% / n=227 (Enrique Pérez-Martín et al., 2000), Guadalajara, 8,9% / n=67 (Criado-Fornelio, 2000) y la Rioja, 4,2% / n=70 (Manzano-Lorenzo et al., 2008).
Como recomendaciones técnicas para la toma de muestras en las necropsias de zorros, indicar que se debe disecar todo el diafragma y posteriormente: 1. Separar un peso mínimo de 10 g de diafragma para la investigación de *Trichinella* spp. encapsuladas y no encapsuladas. 2. Cortar 50 g complementarios de diafragma para posteriores análisis, según anexo III del reglamento. Para futuros estudios, debería valorarse previamente el efecto de los ciclos de congelación-descongelación durante el manejo analítico de las muestras para evitar sesgos en la visualización, por posible destrucción de larvas y quistes y/o disminución de su viabilidad.
Para concluir, insistir en que el peso de la muestra es el principal factor limitante a corregir para mejorar la fiabilidad de la técnica y destacar que se confirma un foco estable de prevalencia a *Trichinella* spp. en zorros en Anoia y que se detecta otro en el Pallars Jussà. Se recuerda también que la cocción tradicional (el estofado) hace seguro el consumo de carnes de caza.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

• Balestrieri, A., Remonti, L., Prigioni, C. 2007. *Hystrix It. J. Mamm.* 18: 17-38. • Criado-Fornelio, A., Gutiérrez-García, L., Rodríguez-Caabeiro, F., Reus-Gracia, E., Roldán-Soriano, M. A., Díaz-Sánchez, M. A. 2000. *Vet. Parasitol.* 92: 245-251. • Fàbregas, X., de Benito, J. 2001. *Eurocarne* 94: 67-76. Madrid. • Gari-Toussaint, M., Tieulié, N., Baldin, J. L., Dupouy-Camet, J., Delaunay, P., Fuzibet, J. G., Le Fichoux, Y., Pozio, E., Marty, P. 2005. *Eurosurveillance* 10: 117-188. • Kapel, C. M. O., Webster, P., Gamble, H. R. 2005. *Vet. Parasitol.* 132: 101-105. • Manzano-Lorenzo, R., Nogal-Ruiz, J.J., Fonseca-Salamanca, F., García-Sancho, R.N., Arroyo Díaz, J.M., Jiménez, S., Fàbregas, X., Colomer, A., Bolás-Fernández, F., Martínez-Fernández, A.R. 2008. 4th Annual Scientific Meeting of MED-VET-NET. Saint-Malo. France. • Enrique Pérez-Martín, J. , Serrano, F. J., Reina, D., Mora, J. A., Navarrete, I. 2000. *J. Wildl. Dis.* 36: 531-534. • Pozio, E. 1998. *Parasitol. today* 14: 35-38. • Pozio, E., La Rosa, G., Serrano, F.J., Barrat, J., Rossi, L. 1996. *Parasitol.* 113: 527-533. • Pozio, E., Rinaldi, L., Marucci, G., Musella, V., Galati, F., Cringoli, G., Boireau, P., La Rosa G. 2009. *Int. J. Parasitol.* 39: 71-79. • Ranque, S., Faugère, B., Pozio, E., La Rosa, G., Tamburrini, A., Pellissier, J.-F., Brouqui, PH. 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 543-547. • UE. 2005. Reglamento (CE) nº 2075/2005. *DOCE L* 338: 60-78. • UE. 2009. *EFSA J.* 223.

INVESTIGATION OF *Triquinella* spp. IN FOXES IN CATALONIA

ABSTRACT: The presence of *Trichinella* spp. was investigated in 286 frozen samples of *musculus tibialis anterior* of foxes (*Vulpes vulpes*) in Catalonia. The samples were classified according to weight. In those weighing more than 5 g, the presence of *Trichinella* was detected by the method of artificial digestion. With the positive findings, individual identification was carried out by trichinoscopic examination on a compression plaque. On samples weighing less than 5 g, individual detection was made directly by compression trichinoscopy. A final retro control by artificial digestion was carried out on these latter samples with negative results. The molecular identification of the *Trichinella* species involved was performed using the ISSR – PCR technique.
Three positive samples were detected (prevalence equals 1.05%) in the areas of Anoia and Pallars Jussà. The molecular identification of the 2 samples from Pallars showed *Trichinella britovi* (20 LPG and 15 LPG). The rate of examination carried out by an expert was one compression plaque per 8 minutes. Technical recommendations were proposed for taking the samples. The investigation concludes that the weight of the sample is the main limiting factor and that two sources of prevalence exist in the above-mentioned areas.

Keywords: *trichinella, investigation, fox, catalonia.*