UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

Epidemiología de *Trichinella* spp. en zorros (*Vulpes vulpes*) en el centro peninsular ibérico.

Dennis Montañez Ruiz

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO de SANIDAD ANIMAL

Área de Parasitología

2016/2017

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

TRABAJO FIN DE GRADO

Epidemiología de *Trichinella* spp. en zorros (*Vulpes vulpes*) en el centro peninsular ibérico.

Dennis Montañez Ruiz

Conformidad de los Directores

Dr. Juan Enrique Pérez Martín Dr. Francisco J. Serrano Aguilera

26 de junio 2017

Juan Enrique Pérez Martín y Francisco J. Serrano Aguilera, profesores numerarios adscritos al área de PARASITOLOGÍA, con destino en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, en Cáceres,

INFORMAN

Que el estudiante de Veterinaria, D. **Dennis Montañez Ruiz,** ha realizado en el mencionado Centro y bajo nuestra dirección, el presente trabajo de investigación titulado "**Epidemiología de *Trichinella* spp. en zorros (*Vulpes vulpes*) en el centro peninsular ibérico**", con el que opta a superar el trabajo fin de grado y con él los estudios conducentes a la obtención del Grado en Veterinaria.

Que en todo momento ha demostrado gran rigor científico en el desarrollo de esta memoria, utilizando todos los medios puestos a su alcance para la consecución de los objetivos marcados.

Por todo lo cual, y para que conste, firmamos el presente en Cáceres, a 26 de junio de 2017.

V° B° Los directores

Dr. Juan Enrique Pérez Martín Dr. Francisco J. Serrano Aguilera

Índice

1. Resumen y palabras clave 9
2. Abstract and Keywords 10
3. Introducción. 11
4. Revisión bibliográfica. 13
4.1 Antecedentes históricos. 13
4.2. Filogenia del género *Trichinella*. 16
4.3. Epidemiología. 22
4.4. Ciclo biológico..... 25
4.4.1. Ciclo sinantrópico. 26
4.4.2. Ciclo parantrópico. 26
4.5. Distribución muscular 28
4.6. Distribución geográfica. 31
4.7. Hospedadores. 37
5. Material y métodos. 40
5.1. Procedimiento laboratorial general. 40
5.2. Muestras de estudio. 42
5.3. Método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético. 44
5.4. Estimación de la carga parasitaria. 48
5.5. Tipificación genética. 49
6. Resultados y desarrollo 50
6.1. Prevalencia global de *Triquinella* spp. 50
6.1.1 Prevalencia según sexo y edad. 50
6.2 Distribución geográfica. 53
6.3 Carga parasitaria y especiación. 55

7. Discusión. 57
7.1 Prevalencia global de *Trichinella* en zorro rojo. 57
7.1.1 Prevalencia según sexo y edad..... 59
7.2 Distribución geográfica 59
7.3 Carga parasitaria y especiación..... 60
8. Conclusiones. 61
9. Bibliografía 63
10. Agradecimientos 72

1. Resumen y palabras clave

La Trichinellosis es una zoonosis endémica en España, causada por especies de nematodos del genero *Trichinella*. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio en carnívoros salvajes, principalmente el zorro (*Vulpes vulpes*), bajo la hipótesis que sostiene que puede ser un importante reservorio ambiental de *Trichinella.* Para ello hemos utilizado 712 zorros (*Vulpes vulpes*), 11 tejones (*Meles meles*), 11 garduñas (*Martes foina*), 1 jineta (*Genetta genetta*) y 1 nutria (*Lutra lutra*), todos ellos obtenidos a través de la caza legal o encontrados muertos en la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

El análisis de muestras lo hemos realizado a través del método oficial indicado en el Reglamento de ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015, en el que se establece la digestión artificial con pepsina y HCL (ácido clorhídrico) como método de elección.

Como resultado hemos obtenido 6 zorros positivos a *Trichinella*, lo que supone una prevalencia del 0,84%. En concreto, se han identificado como positivos 2 zorros de la localidad de Valdemierque (Albusejo, Salamanca), 2 zorros de Miranda del Castañar (Salamanca), 1 zorro de Gallegos de Argañan (Salamanca) y 1 zorro de Villar del Buey (Zamora). De este modo, tras la identificación genética confirmamos que 4 de ellos son *T.britovi* (66%), 1 es *T. spiralis* (16,5%) y el ultimo restante, presenta una parasitación mixta de *T.britovi/T. spiralis* (16,5%).

Como conclusión principal, podemos afirmar que el zorro rojo participa de forma activa en el ciclo silvestre de *Trichinella,* aunque la prevalencia es bastante baja, por ello se hacen necesarios más estudios epidemiológicos para comprobar si podría influir en el contagio a especies de consumo humano como lo son el jabalí y el cerdo doméstico de producción extensiva.

Palabras clave: *Trichinella,* carnívoros, digestión artificial, prevalencia, epidemiología, zorro, *Vulpes vulpes*.

2. Abstract and Keywords

Trichinellosis caused by several nematoda species within *Trichinella* genus is an historically endemic zoonosis in Spain. Present work has been focused in wild carnivores under the hypothesis that they may act as important *Trichinella* reservoir in the environment. Carcasses of 712 red foxes (Vulpes vulpes), 10 badgers (*Meles meles*), 11 stone marten (*Martes foina*), 1 genet (*Genetta genetta*) y 1 eurasian otter (*Lutra lutra*) that were dead found or legally huted in Castilla y León region of Spain were collected. Foream muscle tissues were analyzed using acid-pepsin digestion under the European Commission regulation protocol (2015/1375 of august 10th, 2015).

Among all animals examined, only 6 red foxes resulted positive for *Trichinella* larvae presence, showing a prevalence of 0.84%. To note, 2 foxes were sampled in Valdemierque, 2 in Miranda del Castañar, 1 in Gallegos de Argañán municipalities from Salamanca province, and 1 from Villar del Buey in Zamora province. Species identity was confirmed in all cases, thus *T. britovi* was confirmed in 4 cases (66%), *T. spiralis* in 1 (16.5%) and a mixed infection on *T. spiralis* and *T. britovi* in 1 (16.5%).

As a conclusion, it can be assumed that red fox acts as an active element in the wild cycle of *Trichinella* despite the prevalence is quite low; then, further additional surveys should be carried out in order to test the specific its role as a reservoir for wild boar and domestic pigs that constitute important sources of meat destined to human consumption.

Keywords: *Trichinella,* wild carnivores, artificial digestion, prevalence, epidemiology, Spain, *Vulpes vulpes*.

3. Introducción.

Cuando hablamos de trichinellosis, hablamos sin duda de una de las zoonosis parasitarias más importantes que existen, ya que la ingestión de larvas de *Trichinella* puede resultar mortal para el animal. Tanto animales silvestres, domésticos y humanos pueden verse afectados por la infestación de este parásito. El primer caso conocido de muerte se produjo en 1859, cuando una persona alemana ingirió carne muy infestada, padeciendo fiebre, desvanecimientos, fatiga y dolores musculares. Tras su muerte ZENKER observo unos diminutos gusanos serpenteantes en un pequeño fragmento de tejido muscular. Actualmente, Dupouy-Camet y Bruschi (2007) estiman que entre 100 y 300 larvas de *Trichinella spiralis* producen síntomas clínicos solamente, pero una dosis de entre 1000 y 3000 larvas causa una enfermedad grave, aunque todo esto depende de las características de cada individuo.

Al hablar de *Trichinella* spp. nos referimos a un parásito cosmopolita, existiendo varias especies en distintas áreas geográfica. Como indicamos anteriormente, en España la presencia de este parásito en suidos y carnívoros silvestres es endémica, lo cual es un riesgo para la salud humana debido al posible consumo de dichos animales. Es una parasitación de declaración obligatoria, ya que tiene una gran importancia sanitaria; de tal modo, que, ante un caso positivo, se procede al decomiso total del animal infectado.

En la comunidad autónoma de Extremadura, el sector cinegético tiene una gran importancia y aporta una gran cantidad de ingresos económicos para la región. Estas actividades cinegéticas suponen un problema sanitario, ya que restos de los animales abatidos de los cazadores pueden ser ingeridos tanto por carnívoros silvestres, jabalíes o perros de rehala.

La fuente de contagio más importante en los seres humanos tradicionalmente fue el cerdo doméstico, pero en las últimas décadas, la carne de caballo junto con la de jabalí ha constituido la principal fuente de contagio en Europa, ya que las condiciones de las explotaciones domésticas son mejores y además el número de matanzas domiciliarias ha disminuido enormemente.

Se considera *T. spiralis* (T1) y *T. britovi* (T3) como las especies principalmente responsables de la parasitación en España, produciéndose la infección a través de carne de cerdo (*Sus scrofa domestica*) y de jabalí (*Sus scrofa ferus).* Aunque ya se han diagnosticado jabalíes también con *T. pseudospiralis (Zamora et al.,* 2016).

Trichinella spiralis es, sin lugar a dudas, uno de los parásitos más ubicuos, pues se han reportado casos de infecciones naturales en más de 100 especies de mamíferos, incluyendo carnívoros, roedores e insectívoros (Zimmermann *et al*., 1970). Se considera un parásito reemergente con más de 1800 casos humanos en Europa durante las últimas décadas (Nockler *et al.,* 2005). Por el contrario, algunos países europeos, como Dinamarca u Holanda, están considerados libres de *Trichinella* en la población porcina. No obstante, se puede afirmar que, debido al carácter eurixeno de este parásito, está presente prácticamente en cualquier zona del planeta.

La detección de *Trichinella,* por los servicios veterinarios oficiales, tiene ciertamente un carácter estacional, ligado a los meses donde la actividad cinegética es mayoritaria y donde el jabalí actúa como protagonista principal.

Actualmente, en España sigue sin ser declarada libre de *Trichinella* ninguna explotación ni región, ya que erradicar dicha zoonosis es muy complicado, debido a la amplia gama de hospedadores, en su mayoría salvajes. Aun así, si es cierto que la prevalencia de la parasitación y las tasas de mortalidad se han reducido enormemente.

En este trabajo se pretende estimar la prevalencia de larvas de *Trichinella* en mesocarnivoros silvestres en 4 provincias de Castilla y León, para ello contamos con un total de 736 muestras, en la cuales determinamos la carga parasitaria procesando las mismas con el método de digestión artificial y posteriormente enviando las larvas 1 al ITRC (Instituto Superiore di Sanita de Roma) para su tipificación genética.

Todas las muestras recibidas pertenecen a la comunidad de Castilla y León, en concreto proceden de Ávila, Salamanca, Valladolid y Zamora. En concreto las muestras pertenecen a zorros rojos (*Vulpes vulpes*), tejones (*Meles meles*), garduñas (*Mertes foina*) y nutrias (*Lutra lutra*).

Para llevar a cabo el proyecto, los objetivos los clasificamos de la siguiente manera:

- Estimar y actualizar la prevalencia de *Trichinella* spp. en carnívoros silvestres en el sur de la comunidad de Castilla y León a partir de los casos positivos detectados.
- Identificar las especies de *Trichinella* spp. que parasitan a los mesocarnivoros de la zona estudiada.
- Estudio de las cargas parasitarias de los animales positivos frente a *Trichinella.*
- Análisis de factores como la edad, sexo y distribución geográfica.

4. Revisión bibliográfica.

4.1 Antecedentes históricos.

El descubrimiento de este parásito se produjo en 1835 por James Paget (estudiante de medicina en Londres) ayudado por su profesor R. Owen que publicó una descripción del parásito como una nueva especie (*Trichina*). Posteriormente, se cambió el nombre, ya que estaba asignado previamente a otro animal distinto, un díptero.

El primer y conocido caso de muerte se produjo en 1859 en una granjera alemana, que ingirió carne muy infestada, padeciendo fiebre, fatiga, y unos agudísimos dolores musculares. Tras su muerte, Zenker observó unos diminutos gusanos serpenteando un pequeño fragmento comprimido de tejido muscular que, evidentemente, eran los causantes de la muerte de la chica. A todo lo anterior, se unieron los trabajos de Virchow, que observó adultos de esta especie en un intestino humano 3 días después de la infestación. A partir de este caso, todas las infecciones que se producían estaban unidas a una sospecha de trichinellosis.

Uno de los grandes avances fue el de Leidy en 1846 al postular que la infección en el hombre era debida a la ingestión de carne de cerdo. Posteriormente en 1860 entre Zenker, Virchow y Leuckart ultimaron el ciclo de *Trichinella spiralis*. A continuación, entre 1860 y 1880 se citaron 513 muertes de 8500 casos aproximadamente, lo que suponía un 6% de mortalidad. Concretamente, en 1863 en la localidad alemana de

Hettstädt, se citaron 28 muertes en una epidemia de 158 casos (18% de mortalidad) y aún mayor porcentaje en Hadmersleben, 337 enfermos y 101 muertos. Para el diagnóstico de estos casos se seguían procedimientos in vivo y postmorten, pero tras ellos, siempre se llegaba a la conclusión de que había que cocinar bien todos los productos del cerdo. Esta medida fue insuficiente y en 1866, se legisla en Alemania la obligatoriedad de inspeccionar microscópicamente la carne porcina dedicada al consumo humano, instaurándose así la práctica de la trichinelloscopia, que poco después, se extendió por toda Europa.

Los Estados Unidos (EEUU), escépticos con el sistema de inspección, no lo adoptaron, ya que no habían sufrido casos humanos graves de parasitación por *Trichinella,* cuestionando, a la vez, su fiabilidad, por la baja precisión de la técnica. Además les resultaba muy costoso. Esto provocó que muchos países europeos prohibieran la importación de canales de cerdo procedentes de los EEUU, pero aun así, sólo la implantaron ocasionalmente para las carnes que exportaban.

Gracias a esta inspección veterinaria del ganado porcino en Europa durante un siglo y medio, la situación actual no es tan dramática como lo fue en aquellos años, pero aun así, sigue existiendo un riesgo latente. Aunque la prevalencia de la trichinellosis humana ha descendido de forma drástica desde los años que comentamos, hoy día continúa ampliamente extendida por todo el mundo.

En el año 1987, se postuló una nueva técnica de diagnóstico. La digestión Baermann, de la que posteriormente se han ensayado muchas variantes. Los métodos de digestión artificial incluyen la digestión enzimática de muestras de tejido muscular individuales o agrupadas, y utilizan la homogeneización o trituración mecánica, la agitación y la incubación. Se basa esencialmente en simular, a nivel laboratorial, la digestión que se produce en el estómago de un animal.

En las últimas décadas, la digestión artificial de muestras musculares para la detección de larvas de *Trichinella* ha demostrado ser una técnica más sensible que la trichinelloscopia, además de rápida y económica cuando se analizan un gran número

de muestras.

Hay animales, como el ganado porcino, que toleran bastante bien infestaciones por *Trichinella* tolerando infestaciones con miles de larvas de *Trichinella,* que para un humano seria letal. De tal forma, que solo 1 larva por gramo de carne que ingiera puede provocar un cuadro clínico cuya gravedad puede variar.

Esta zoonosis es sumamente importante, a pesar de que actualmente el 99% de los afectados consigue salvarse gracias a los tratamientos médicos y a que los brotes en humanos se han reducido enormemente gracias a la inspección veterinaria.

El método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético es la técnica más recomendable para el uso rutinario. Mientras que el examen triquinoscópico no consigue detectar con la suficiente nitidez las especies de *Trichinella* no encapsuladas que infectan a animales domésticos, salvajes y a seres humanos, por lo que no es un método adecuado de detección. Otros métodos, como los ensayos serológicos, pueden ser útiles para la vigilancia epidemiológica si han sido validados por un laboratorio de referencia, pero no son adecuados para detectar la presencia de "triquinas" en animales individuales destinados al consumo humano.

El Reglamento (CE) nº 2075/2005 (de la Comisión, de 5 de diciembre de 2005) estableció que a partir del 31 de diciembre de 2010, dada su baja sensibilidad, la triquineloscopia debía ser sustituida en Europa por la digestión artificial pépsica, pasando a ser el único método de diagnóstico oficial junto con otros procedimientos equivalentes reconocidos por la Unión Europea (UE), como, por ejemplo, el Método de digestión de muestras colectivas con asistencia mecánica/técnica de aislamiento por filtración o el Método de digestión de muestras colectivas con asistencia mecánica/técnica de sedimentación, entre otros. Sin embargo, en España se ha seguido permitiendo, en determinadas situaciones (matanzas domiciliarias y "mata cuelga" en las monterías de jabalí) la trichinelloscopia, como se contemplaba en el Plan Nacional de contingencia frente a "triquina" (2011).

Actualmente, el análisis de las muestras debe realizarse siguiendo el método oficial

indicado en el Reglamento de ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015, por el que se establecen "normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne", publicado por el Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) el 10 de agosto de 2015, en el cual se establece, entre otras cuestiones, la digestión artificial con pepsina y HCL como método de elección y descarta la trichinelloscopia por su baja sensibilidad.

4.2. Filogenia del género *Trichinella*.

Desde que se determinó la teoría de la evolución y esta fue aceptada por la comunidad científica, los taxones "linneanos" se han usado para clasificar a los seres vivos; pero con el paso del tiempo, estas categorías se han visto sobrepasadas para describir los árboles filogenéticos, ya que éstos son cada vez más complicados. De este modo, utilizamos los grupos filogenéticos propuestos en los últimos estudios para la clasificación de *Trichinella*. (Cavalier Smith, 1998; De Ley y Blaxter, 2002; Adl *et al.,* 2005).

Especiación del género *Trichinella*:

Todas las especies son, morfológicamente, casi idénticas, y comparten una amplia gama de hospedadores.

- ***Dominio*** *Eukaryota*
  - ***Clado*** *Opisthokonta*
    - ***Reino Animalia***
      - ***Subreino*** *Metazoa*
        - ***Phylum*** *Nematoda*
          - ***Clase*** *Enoplea (Aphasmidea)*
            - ***Subclase*** *Enoplia*
              - ***Orden*** *Trichurida*
                - ***Superfamilia*** *Trichinelloidea*
                - ***Familia*** *Trichinellidae*
                - ***Género Trichinella***

El hecho de que *Trichinella* sea una especie parásita que posee una amplia gama de hospedadores susceptibles, además de poseer una variación interespecífica mínima desde el punto de vista morfológico, hace que este género desde su descubrimiento

fuera considerado monoespecífico, denominándose como *Trichinella spiralis* (Owen, 1835). Todo cambio en 1972, cuando se descubrió que existían diferencias biológicas entre cepas de distinta procedencia geográfica y se comprobó que existía un aislamiento reproductivo total entre las supuestas cepas, de modo que surgió la descripción de otras especies diferentes.

Actualmente, el genotipado e identificación de *Trichinella* se basa en medios moleculares (Pozio y La Rosa, 2003), a través de los cuales, se reconocen la existencia de doce taxones genética y biológicamente divididos en dos Clados, que se diferencian en la presencia o ausencia de la cápsula de colágeno intramuscular (Zarlenga *et al*., 2006).

- **CLADO ENCAPSULADO.**

A este grupo pertenecen seis especies claramente ubicadas sistemáticamente hablando *(**T. spiralis, T. nativa, T. britovi, T. nelsoni, T. murrelli y T. patagonensis**)* y otros tres genotipos de taxonomía incierta (**T6, T8 y T9**), además de la recientemente descrita ***T. patagonensis.*** Todas ellas forman quiste en la musculatura del hospedador.

- **CLADO NO ENCAPSULADO.**

Con 3 especies, a la fecha, identificadas como ***T. papuae, T. zimbabwensis, T. pseudospiralis.***

Especie	T	Hospedadores	Distribución
Clado encapsulado			
Trichinella (T.) spiralis (Owen, 1835) (Railliet, 1895)	T1	Mamíferos (cerdo ++, rata ++)	Cosmopolita
T. nativa (Britov y Boev, 1972)	T2	Mamíferos (cerdo -, rata -)	Ártica-subártica (América, Europa, Asia)
T. britovi (Pozio *et al*., 1992)	T3	Mamíferos (cerdo ±, rata ±)	Europa, Asia, África (Oeste)
T. murrelli (Pozio & La Rosa, 2000)	T5	Mamíferos	Norteamérica (templada)
Trichinella sp. (Pozio *et al.,* 1992)	T6	Mamíferos	Ártica-subártica (América)
T. nelsoni (Britov y Boev, 1972)	T7	Mamíferos (cerdo -, rata -)	Este y sur de África
Trichinella sp. (Pozio *et al.,* 1992)	T8	Mamíferos	África (Sudáfrica y Namibia)

Trichinella sp. (Nagano *et al.,* 1999)	T9	Mamíferos	Japón
T. patagonensis (Krivokapich *et al.,* 2008)	T12	Puma	Argentina
Clado no encapsulado			
T. pseudospiralis (Garkavi, 1972)	T4	Mamíferos, aves (cerdo ±, rata ±)*	Cosmopolita
T. papuae (Pozio *et al.,* 1999)	T10	Mamíferos, Reptiles *	Papua Nueva Guinea
T. zimbabwensis (Pozio *et al.,* 2002)	T11	Mamíferos, Reptiles *	África (Sur del Sáhara)

Tabla 1. Pozio, E., Murrell, K.D. (2006) Systematics and epidemiology of Trichinella.

- CLADO ENCAPSULADO

❖ ***Trichinella spiralis* (T1).**

Esta especie es la más cosmopolita, hallada en animales domésticos, sinantrópicos, silvestres y en aislamientos humanos (Pozio, 2007). Es la especie más frecuente en la región Extremeña tanto en cerdo doméstico como en jabalíes (Serrano *et al*., 1993). El ciclo parantrópico de *T. spiralis* incluye una amplia gama de carnívoros salvajes, lo que podría ser el origen de la introducción del ciclo de vida en una población de hospedadores domésticos (Dick y Pozio, 2001). En el ciclo doméstico, los restos de carne de cerdos infectados son la fuente de infección para especies sinantrópicas, como ratas, caballos y gatos callejeros.

En cerdo doméstico y jabalí, el parásito alcanza cargas parasitarias enormes, de hasta más de 3000 larvas por gramo, sin que esto produzca enfermedad en el animal, de modo que podemos afirmar que *T. spiralis* está perfectamente adaptado a la vida parasitaria. (Kapel y Gamble, 2000; Kapel, 2001). *T. spiralis* es el principal agente etiológico de Trichinellosis humana (Dupouy-Camet, 2007).

❖ ***Trichinella nativa* (T2) *y Trichinella genotipo T6.***

Trichinella nativa afecta principalmente a carnívoros silvestres que viven en zonas frías de Asia, América del Norte y noreste de Europa. Tiene una estrecha relación con *Trichinella genotipo T6*, aunque ésta parece estar restringida a varias regiones de Canadá (Ontario, Manitoba, Nunavut) y los Estados Unidos (Alaska, Montana, Idaho y Pensilvania). Los principales hospedadores son terrestres (osos pardos (*Ursus arctos*) y

osos negros (*Ursus americanus*), mapaches (*Procyon lotor*), linces (*Lynx pardinus*), lobos (*Canis lupus*), zorros (*Vulpes vulpes*)) y carnívoros marinos (osos polares (*Ursus maritimus*), morsas (*Odobenus rosmarus*) y focas (*Phocidae*)) (Forbes, 2000; Kapel y Gamble, 2000; La Rosa *et al*., 2003).

Esta especie es capaz de sobrevivir en los músculos congelados de carnívoros hasta 5 años (Dick y Pozio, 2001), pero no en suidos y ratones. La pérdida de este carácter demuestra una baja infectividad en cerdos y una alta adaptación de *T. nativa* a los carnívoros (Kapel y Gamble 2000; Kapel, 2001). La población humana que está en riesgo de infección es aquella que consume carne de los citados hospedadores, que viven en zonas frías de Canadá, Groenlandia y Rusia (Nelson *et al.,* 2003; Schellenberg, *et al,* 2003; Serhir *et al.*, 1999) o cazadores de Europa y los Estados Unidos que consumen carne cruda o poco cocinada de osos cazados en el ártico o regiones subárticas.

- ***Trichinella britovi* (T3).**

Esta especie podemos encontrarla fácilmente en Europa, Asia, África septentrional y occidental incluida dentro de los ciclos de vida silvestre (Pozio, 2007, Pozio *et al.*, 2009). *T. britovi* comparte características morfológicas y biológicas con *T. spiralis*, pero su capacidad reproductiva es menor tanto en cerdos como en ratas, siendo más resistente a la congelación (Kapel y Gamble, 2000). Es en carnívoros silvestres donde mayor cantidad de este parásito podemos encontrar.

Vive a través de las relaciones tróficas entre la fauna salvaje (jabalíes y carnívoros de las familias Canidae, Felidae, Mustelidae, Ursida y Viverridae) y especies domésticas (cerdos domésticos criados con sistemas de pastoreo extensivos y equinos). En Europa, *T. britovi* se ha detectado en el 89%, 38% y 18% de los aislamientos de *Trichinella* de los carnívoros, jabalíes y cerdos domésticos, respectivamente (Pozio *et al.,* 2009). El hombre también puede padecer esta parasitosis, siendo la segunda especie de *Trichinella* más común en humanos, por detrás de *T. spiralis,* debido principalmente al consumo de cerdo de montanera, caballo y carne de jabalí fruto de la caza. En Italia se presentaron más de 300 brotes por este parásito en 1986.

- ***Trichinella murreli* (T5).**

  Se considera a *T. murreli* una especie alopática de *T. britovi*, debido a la separación post-glaciar de Eurasia y América. Mientras *T. britovi* predomina sobre clima templado de la zona euroasiática, *T. murreli* continua su especiación por el aislamiento geográfico en ambientes climáticos similares de América del Norte, la mayor parte de EEUU y sur de Canadá (Pozio y La Rosa, 2000). Únicamente se ha aislado este parásito en carnívoros salvajes, produciéndose casos humanos tras el consumo de carne de osos negros.

- ***Trichinella nelsoni* (T7).**

  Dicha especie se ha detectado en el este de África, desde Kenia a Sudáfrica (Marucci *et al*, 2009). Tolera muy bien las altas temperaturas y sus principales hospedadores son felinos (leones (*Panthera leo)*, guepardos (*Acinonyx jubatus)*, etc.), carroñeros (hienas (*Hyaenidae*) y facoceros (*Phacochoerus)*.

- ***Trichinella* genotipo T8.**

  Genotipo filogenéticamente relacionado con *T. britovi*, aislado en hienas y leones del Parque Nacional Kruger, en Sudáfrica, y del Parque Nacional de Etosha en Namibia (Pozio *et al*., 1992; Marucci *et al.,* 2009).

- ***Trichinella* genotipo T9.**

  Los aislamientos de *Trichinella* en la fauna salvaje japonesa fueron identificados originalmente como *T. britovi*, pero posteriormente se agruparon en un genotipo distinto, llamado *Trichinella genotipo T9*, filogenéticamente relacionado con *T. murrelli* (Pozio y Murrell, 2006). *Trichinella genotipo T9* está presente en zorros rojos (*Vulpes vulpes)*, mapaches (*Procyon lotor*), osos negros japoneses (*Ursus thibetanus japonicus*), osos marrones *(Ursus arctos)* y perros domésticos (*Canis lupus familiaris)* de Japón. *(Kanai et al.,* 2007)

- ***Trichinella patagonensis.***

  Este genotipo es encapsulado y fue aislado en 2008 en un puma (*Puma concolor)* en

Argentina y se le identificó como *Trichinella T12.* (Krivokapich *et al.*, 2008).

Todas estas especies y genotipos inducen el desarrollo de una cápsula de colágeno con un espesor variable, de modo que puede ser detectada por microscopía lumínica durante la fase de infección muscular.

A continuación vamos a hablar de tres especies que sólo producen una cápsula detectable únicamente por microscopía electrónica, ya que su espesor es muy fino. De este modo, incluimos a estas especies en el Clado no encapsulado.

- CLADO NO ENCAPSULADO

Este se puede subdividir en dos grupos, por un lado las "triquinelas" que circulan entre mamíferos y las aves, y, por otro, las que infectan reptiles.

❖ ***Trichinella pseudospiralis* (T4).**

Esta fue la primera especie no encapsulada que se descubrió (Garkavi, 1972). Posee una gran complejidad biológica, pues a pesar de tener una distribución cosmopolita, suele ser bastante infrecuente en la naturaleza. Puede infestar tanto a mamíferos (se ha encontrado en catorce especies diferentes) como a las aves (en tres especies diferentes) (Pozio, 2005).

Se han detectado casos en humanos en la península de Kamchatka, Thailandia y Francia, con desenlaces a veces fatales (Pozio y Murrell, 2006).

❖ ***Trichinella papuae* (T10).**

En 1988 se detectaron larvas no encapsuladas de *Trichinella* en cerdos domésticos criados de forma tradicional en Papúa Guinea (Owen *et al*., 2000). Se procedió a la identificación de su genotipo, lo que permitió el encuadre de *T. papuae* como una nueva especie (Pozio *et al*., 1999). El rango de hospedadores que posee es variable, pues esta especie no infecta a aves (La Rosa *et al*., 2001), pero se ha detectado en diferentes reptiles y mamíferos, incluyendo cerdos de cría, silvestres y la especie

humana (Pozio *et al*., 2004).

Las larvas tiene la capacidad de sobrevivir en canales en descomposición más tiempo que el resto de especies, lo que facilita aún más la transmisión. Se descubrió que larvas de esta especie mantuvieron su infectividad en musculatura de cerdo expuesto a 35ºC durante 9 días (Owen y Reid, 2007). Así, el ciclo parantrópico de *T. papuae*, puede introducirse mediante las relaciones tróficas de sus hospedadores, llegando a infectar a los seres humanos. De hecho, *T. papuae* fue identificada como el agente causal de un brote de trichinellosis, que involucró a 19 personas, tras la ingestión de un cerdo salvaje (Kusolsuk *et al.,* 2008).

- ***Trichinella zimbabwensis* (T11).**

  Especie muy similar a *T. papuae*, denunciada sólo en reptiles silvestres y de cría en África (Zimbabwe, Mozambique, Sudáfrica y Etiopía). En 1995, *T. zimbabwensis* se aisló de 256 cocodrilos del Nilo entre 648 individuos (39,5% de prevalencia), criados en 18 piscifactorías entre las 29 existentes en Zimbabwe en ese momento. En 2002, 11 de las 27 granjas de cocodrilos (40,7%) todavía tenían animales infectados (Pozio *et al.,* 2002). De los 28 varanos del Nilo investigados (*Varanus niloticus*), cinco de ellos mostraron larvas de *T. zimbabwensis* (17,6%). (Pozio, 2007; ITRC). Aunque experimentalmente es capaz de infectar a los mamíferos (Pozio *et al.,* 2002, Pozio, 2007), las infecciones en humanos o en animales domésticos, no han sido documentadas hasta el momento.

4.3. Epidemiología.

El ciclo de *Trichinella* se caracteriza porque un mismo hospedador puede actuar como hospedador definitivo e intermediario a la vez. Este es un ciclo directo y ninguna fase de vida se realiza fuera del hospedador. Es un ciclo autoheteroxeno, ya que tanto la fase adulta como la fase larvaria se desarrolla dentro del hospedador y ninguna de estas fases se produce en el medio ambiente.

La transmisión se realiza únicamente por ingestión de carne que contenga larvas 1 enquistadas, de modo que el hábito depredador, caníbal o carroñero sostiene dicho ciclo. Aun así, se conoce la capacidad de adaptación de *Trichinella* a hospedadores no

carnívoros, a los que acceden las formas larvarias infectivas.

El proceso consta de dos etapas, la primera de ellas es la fase intestinal en la que la infección se inicia cuando el hospedador ingiere larvas musculares (L1), a través del consumo de carne infectada. En este momento, tanto el tejido muscular como la célula nutritiva que envuelve la larva son digeridos por la pepsina y el HCL del estómago, proceso que dura solamente unos minutos, no experimentando ningún desarrollo mientras éste está en el estómago.

La larva 1 (L1) penetra rápidamente en su nicho intracelular en el intestino delgado. El parásito llega a ocupar una gran cantidad de células, de modo que este estado se define como intramulticelular. Estas células no se destruyen, sino que se adaptan para albergar el parásito, existiendo una fusión de las membranas de las células columnares y se produce lo que llamamos un sincitio.

Aunque se pueden localizar en yeyuno e íleon, es generalmente el duodeno donde la mayoría de las larvas se estabilizan. En este momento, a partir de las L1, se producen cuatro mudas muy rápidamente, que pueden finalizar en unas 30 horas aproximadamente, de modo que en algo más de un día podemos tener adultos (ver Figura 1).

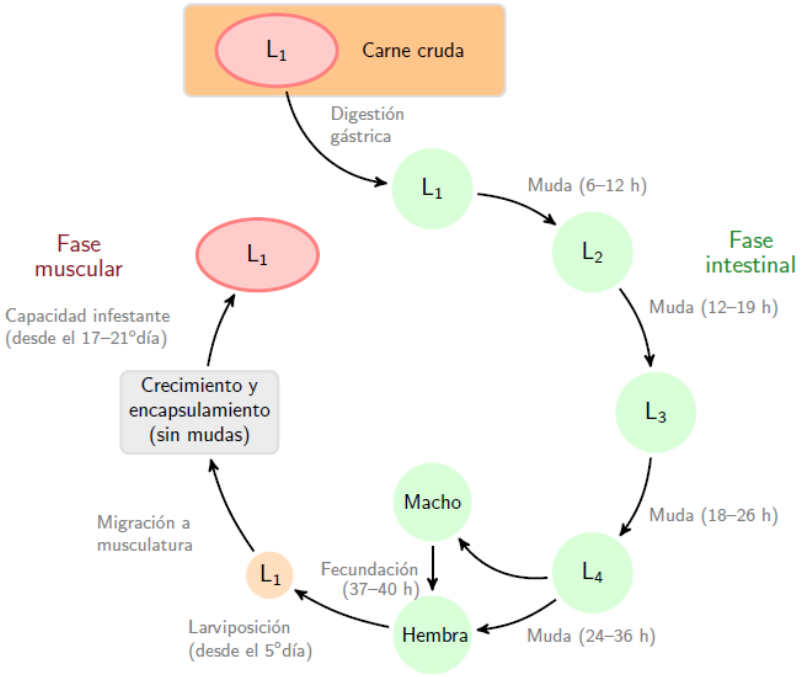


Figura 1. Esquema del ciclo vital y cronobiológico *Trichinella spiralis.* Cada hospedador alberga todas las fases evolutivas, tanto adultas como larvarias, asumiendo así el rol de hospedador definitivo e intermediario sucesivamente (Blanco-Ciudad, 2012).

Una vez producidas las cuatro mudas, y llegados a la madurez sexual, se produce el apareamiento inmediatamente. Las hembras suelen ser fecundadas entre las 37 y 40 horas postinfestación. Las hembras recién fecundadas, se introducen nuevamente en la pared intestinal, en las glándulas de Lieberkünh y al quinto/sexto día post-infección inician, de modo vivíparo y directamente en la submucosa intestinal, la puesta de las larvas 1 de nueva generación.

Los machos, y algo más tarde las hembras, son expulsadas del intestino debido a la respuesta inflamatoria que se produce tanto, inespecífica como específica. Generalmente, su supervivencia depende, en buena parte, de la especie hospedadora, de la existencia de resistencia adquirida, así como de posibles factores inmunodepresores existentes. En el cerdo sobreviven hasta 6 semanas post-infección, mientras que en roedores se produce la expulsión al cabo de un par de semanas. Incluso la respuesta inflamatoria originada puede expulsar, no sólo a los adultos, sino también a las L1 recién desenquistadas, que salen por heces estando aún vivas, siendo ésta una posibilidad infectiva para los herbívoros, ya que, a través de la coprofagia podrían seguir su ciclo en otro animal.

En la siguiente fase, las L1, que se producen penetran en la lámina propia de la vellosidad y desde aquí pasan a los nódulos linfáticos y con menor frecuencia a los capilares. Finalmente, llegan hasta la circulación general, distribuyéndose por todo el organismo, alcanzando el tejido muscular estriado, y diversas vísceras, si bien en estas no podrán establecerse. Su localización muscular es dependiente de la carga parasitaria y las preferencias por especie y hospedador. En esta fase de migración la ubicación final en musculatura está muy relacionada con el nivel de irrigación y actividad del músculo, de modo que los músculos que tienen una alta actividad son los más altamente parasitados, como son diafragma, lengua, maseteros, intercostales, etc.

De este modo, el ciclo biológico finaliza en una fase muscular, donde uno de los músculos de elección por parte de las larvas es el diafragma, siendo el músculo más utilizado en las técnicas de detección de larvas en carnes destinadas a consumo humano, ya que, *a priori,* cabe esperar una mayor presencia de larvas.

Las larvas penetran en las células musculares, que paulatinamente se transforman en células nodrizas, al tiempo que la larva crece durante 20 días y, finalmente, acaba aislándose mediante la formación de una gruesa pared quística en el interior de dicha célula. Cada quiste se nutre por una red capilar que se neoforma en torno a la célula nodriza, manteniendo a la larva durante un periodo que depende de la especie y del hospedador (Kapel, 2000). Las larvas crecen de tamaño y adoptan morfología definitiva durante unas dos semanas, siendo infectantes a partir del día 17-21 post-infestación. En general, en suidos a partir de las 40 semanas se produce un descenso paulatino en el número de L1 infestante, que van siendo calcificadas o incluso degeneran, de modo que al cabo de año y medio o dos años, la carga parasitaria puede descender marcadamente o incluso desaparecer por completo.

4.4. Ciclo biológico.

El género *Trichinella* posee un ciclo epidemiológico complejo, debido a la amplia gama de hospedadores potenciales que posee, desde omnívoros y carnívoros hasta herbívoros como el caballo. Tiene un carácter eurixeno debido a la amplia gama de hospedadores que posee, lo que le permite producir interconexiones entre animales silvestres y domésticos, así como entre éstos y humanos.

Por esa gama tan extensa de hospedadores susceptibles, el ciclo epidemiológico se complica, pero lo reduciremos a dos tipos de ciclo: Selvático (parantrópico) y doméstico (sinantrópico), que aunque en principio están bien diferenciados pueden llegar a conectar entre sí ocasionalmente.

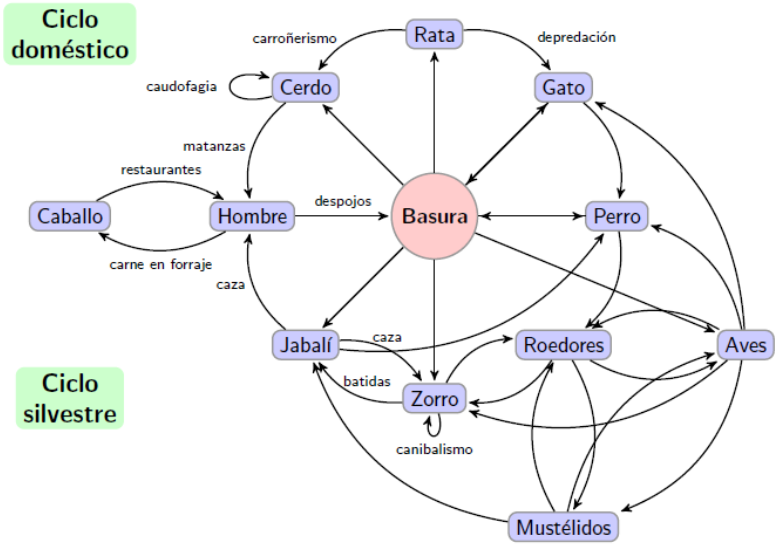


Figura 2. Esquema del ciclo epidemiológico de *Trichinella* spp. Los supuestos ciclos domésticos y silvestres están interconectados de múltiples formas, muchas de ellas facilitadas por los humanos (vertederos, actividad cinegética, etc.) (Blanco-Ciudad, 2012).

4.4.1. Ciclo sinantrópico.

Este ciclo también denomina indebidamente como ciclo doméstico, ya que depende en gran medida del manejo de los animales domésticos y la influencia de la actividad humana y ganadera sobre los animales de su entorno.

Por un lado, tenemos el ciclo urbano, donde el cerdo doméstico juega un papel como protagonista único, o entre un cerdo y animales sinantrópicos como el perro o el gato. Actualmente, este tipo de ciclo ha desaparecido prácticamente, debido a las óptimas medidas sanitarias.

Por el otro lado, tenemos el ciclo rural, que se produce entre cerdos domésticos de explotaciones extensivas y otros animales, que se puede originar y mantener a través del carroñerismo, o en algunas ocasiones por la ingestión de heces de carnívoros infectados. En Europa occidental este tipo de ciclo doméstico sólo se ha detectado recientemente entre pequeñas piaras de cerdos en el sur de Finlandia y en algunas regiones de España (Pozio, 1998).

4.4.2. Ciclo parantrópico.

Este ciclo también se denomina selvático y se basa en la transmisión hospedador-presa (depredación), sin excluir el canibalismo y el carroñerismo (necrofagia). Entre los animales silvestres conviene destacar al zorro, que según Pérez-Martin *et al.,* 2007, ostenta una prevalencia del 3,59% en Extremadura. Estos animales mantienen y difunden la parasitación debido al carnivorismo y el carroñerismo de otros animales infectados o bien a partir del canibalismo.

El hombre puede infestarse de ambos ciclos, al ingerir carne de cerdo (*T. spiralis*), jabalí u otros hospedadores (*T. britovi, T. nativa, T. spiralis*), aunque el hombre se convierte en fondo de saco epidemiológico.

La transmisión al hombre se produce con frecuencia al ingerir carne de caza infectada. Para evitar esto, la legislación establecen unas pruebas de obligada realización, siendo a día de hoy la técnica de elección, la digestión artificial ácido-pépsica (Reglamento (CE) no 2015/1375, de la Comisión de 10 de agosto de 2015). Es de especial relevancia

la interconexión de animales salvajes con animales domésticos como el cerdo, especialmente el ibérico, el cual durante la última etapa de su vida productiva habita parajes adehesados, en los que puede tener contacto directo con animales salvajes infectados. Así, vía cerdo doméstico, los humanos también se ven afectados por el ciclo silvestre. En Extremadura se ha citado una prevalencia de *Trichinella* en jabalíes del 0,15 %, mientras en cerdo de matanza domiciliaria sólo alcanzaba el 0,021% (Blanco *et al.,* 2009), reduciéndose en relación directa y muy significativa con la intensividad del sistema de explotación.

Dentro del ciclo parantrópico, podemos encontrar una subdivisión de varios ciclos, según la localización geográfica en la que se produce. De este modo, tenemos un ciclo ártico que se caracteriza por la depredación, descrito y mantenido en carnívoros terrestres (oso polar (*Ursus maritimus*), oso pardo (*Ursus arctos*), zorro ártico (*Alopex lagopus)*, lince y perros de trineo) e incluso marinos (foca y morsa). De esta forma, Born *et al.* (1982) encuentran un 1,6% de parasitación en morsas, porcentaje que atribuyen a la alta prevalencia en osos polares (20%) y perros de trineo (91%), lo que posiblemente implique la existencia de hospedadores paraténicos o de transporte, como podrían ser insectos, aves o peces, especialmente en aquellos carnívoros cuya alimentación no incluye a los anteriores. Otra variedad de ciclo parantrópico es el "ciclo africano", que tiene lugar en zonas tropicales del este de África, implicando hienas, canidos silvestres, félidos y suidos, el cual se transmite por la depredación y el carroñerismo. Por último, el "ciclo templado", focaliza la variedad del ciclo parantrópico que encontramos en casi toda Europa, incluida España, así como en zonas templadas de Asia, Norteamérica y Sudamérica. Se mantiene gracias al carnivorismo, carroñerismo y canibalismo entre animales silvestres como zorros, lobos, gatos monteses (*Felis silvestris*), mustélidos y jabalíes, principalmente (Campbell, 1983).

4.5. Distribución muscular

La distribución larvaria muscular de las especies de *Trichinella* no es la misma en toda la musculatura de los hospedadores, sin embargo, muestra preferencia hacia determinadas zonas en las que la intensidad larvaria se multiplica. Normalmente se distribuyen de forma irregular, incluso dentro del mismo músculo, concentrándose mayoritariamente cerca de las inserciones tendinosas. Esto es debido a la riqueza vascular del músculo, que proporciona los nutrientes y oxigenación necesaria para la supervivencia de la larva.

Una vez formado el quiste en las fibras musculares, se produce la génesis de una red capilar circundante y las fibras musculares son modificadas por la L1; de este modo, pierden sus miofibrillas y se convierten en una célula metabólica, que sirve de soporte vital a la larva que contiene, llamándose células nodrizas o "nurse cells".

Un estudio de Hughes y Harley en 1977 pone de manifiesto que las larvas musculares tienen tropismo por las fibras musculares con mayor actividad, atraídas por una concentración creciente de cloruro potásico o ácido láctico en las mismas.

Esta información es imprescindible para el diagnóstico correcto de *Trichinella*, ya que la elección correcta del musculo que hay que analizar aumenta notablemente la sensibilidad de la prueba. Aun así, la distribución muscular de las larvas se puede ver afectada por diversos factores como son la carga parasitaria del hospedador o el propio hospedador como tal. De este modo, la distribución muscular es más aleatoria en infecciones bajas y puede alterar el orden de preferencia que se observa en infecciones más intensas (Serrano *et al*., 1999; Kapel, 2001). La especie parasitaria también influye en la distribución muscular, por la distinta infectividad que produce cada una. Esta variabilidad también influye en la patogenia humana, donde la infección por *T. spiralis* es más severa que la generada por *T. britovi*, debido a que las hembras de esta última son menos prolíficas (Pozio *et al.,* 1993).

Múltiples estudios han demostrado, igualmente, diferencias significativas en cuanto a la capacidad infectante de distintos genotipos de *Trichinella* en la población porcina (Pozio *et al.,* 1992; Pozio y Kapel, 1999; Pozio y La Rosa, 2000).

Si bien es cierto que la ineficacia de algunas especies, en parte, depende de las diferentes razas, la uniformidad en la distribución muscular, por parte de los distintos genotipos de *Trichinella* en los cerdos domésticos y jabalíes, coinciden con las observaciones anteriores realizadas con relación a *T. britovi y T. spiralis* y publicadas por Kapel *et al* en 1998.

Las mismas apoyan que la distribución muscular larvaria varía en función de la especie hospedadora, y no tanto en función del genotipo de *Trichinella*, nivel o intensidad de infección. En los jabalíes sucede que con bajos niveles de infección (unas 10 semanas post-infección) aumenta la carga larvaria tanto en diafragma como en la base de la lengua (Kapel, 2001). De igual manera, Serrano *et al.,* en 1999, observaron relaciones similares en cerdos domésticos.

La localización preferida por las larvas de *T. spiralis* en cerdos infectados experimentalmente con escaso número de larvas, son los músculos sublinguales, seguidos de diafragma, psoas mayor y músculos abdominales; por otro lado, cerdos infectados con más de 4000 larvas por gramo (LPG) la distribución es distinta, siendo los pilares del diafragma los músculos más parasitados, seguidos de sublinguales, posas mayor, maseteros y, por último, abdominales (Pérez Martín *et al.* 1992).

En un estudio experimental realizado en jabalíes por Kapel en 2001, se evalúa la distribución muscular de siete genotipos del genero *Trichinella* (T1, T2, T3, T4 USSR, T4 USA, T4 AUST, T5, T6 y T7), observándose que el comportamiento en cuanto a distribución muscular de las L1 para diferentes grados de infección inicial estaban en concordancia con los resultados obtenidos por trabajos anteriores (Zimmermann *et al.*, 1970), produciéndose una distribución muscular irregular en el caso de suidos infectados con baja dosis parasitaria y una distribución muscular más uniforme en el caso de parasitaciones con mayor carga, estando en el último caso, los pilares del diafragma claramente definidos como el músculo con mayor tropismo, seguido de lengua, maseteros y abdominales.

Sin embargo, el principal factor en la distribución muscular de L1, es el hospedador, detectándose diferencias significativas entre omnívoros, herbívoros y carnívoros. El grupo investigador liderado por el Dr. Edoardo Pozio estudiaron la distribución larvaria

muscular de *Trichinella spiralis* en el caballo, comprobando su predilección por los músculos de la cabeza, en particular, buccinador, lengua, músculo elevador del labio y maseteros. Dichos músculos contenían mayor número de larvas por gramo con respecto al diafragma (Pozio *et al.,* 1999).

En cuanto a los carnívoros, la predilección por los distintos grupos musculares por parte de las larvas es diferente. De este modo, en hospedadores como el zorro, las especies encapsuladas prefieren los músculos de las extremidades anteriores, lengua y diafragma, mientras que en las especies no encapsuladas predominan en el diafragma (Kapel *et al.,* 2005).

Otro ejemplo que demuestra las diferentes tendencias larvarias en distintos hospedadores, podemos encontrarlo en el estudio realizado por Mikkonen *et al.* (2001) en Finlandia, a partir de los análisis efectuados en perros mapaches (*Nyctereutes procyonoides*), demostrando que los músculos que albergan las mayores cargas larvarias tanto para *T. nativa* como *T. spiralis* fueron los flexores del carpo, lengua y músculos oculares (oblicuos y rectos).

Pozio *et al.* (2004) en infecciones experimentales llevadas a cabo con las dos especies no formadores de quistes más recientemente descubiertas, *T. papuae* y *T. zimbabwensis,* estudiaron la carga parasitaria en varios grupos musculares de varanos (*Varanus exanthematicus*) y caimanes (*Caiman cocodrilus*), obteniendo una mayor intensidad de parasitación en el primero, pero independientemente de las especies hospedadora y parásita, la localización preferida por el parásito en estos reptiles fue la lengua en infecciones altas (>1000 LPG), y la musculatura de los miembros torácicos, en los casos de cargas parasitarias medias o bajas (<400 LPG).

A la vista todo ello, podemos asegurar que la distribución muscular sigue en cada especie hospedadora un patrón determinado cuando existen elevadas intensidades de infección, mientras que en aquellos casos donde la infección es leve, es diferente o al menos más aleatorio. Por lo tanto, es concluyente que la distribución muscular no sólo depende del hospedador, sino también de la especie parásita y la susceptibilidad concreta de cada hospedador a cada una de las posibles especies infectivas (Serrano *et*

al., 1999).

4.6. Distribución geográfica.

Trichinella es uno de los parásitos zoonósicos más extendidos en todo el mundo (Pozio, 2007). Tan solo un número limitado de países tiene un sistema de registro oficial de infecciones humanas o animales, por lo que no es fácil obtener una información epidemiológica fiable sobre infecciones en humanos y animales de todo el mundo.

Así, en la mayoría de países, los estudios y la recogida de datos sobre la infección han sido, y siguen siendo, de carácter voluntario por parte de médicos, veterinarios, biólogos, zoólogos y epidemiólogos, lo que, a menudo propicia una información deslavazada e incompleta (Pozio, 2007).

En España se presenta una situación epidemiológica similar a la de los países de Europa del este, es decir, que se presentan tanto el ciclo doméstico como el selvático, mientras que en otros países mediterráneos como Francia e Italia únicamente se presenta el ciclo silvestre. La presencia del ciclo doméstico en España se debe a la cría de cerdos en extensivo, de la matanza domiciliaria y además se puede producir el hábito alimenticio de estos animales con productos de desecho de cocina y mataderos. Además de ello, las dos especies más importantes en nuestro país *T. spiralis y t. britovi*, se encuentran muy distribuidas en la naturaleza, favoreciendo la conexión entre el ciclo doméstico y el silvestre, lo que facilita la transmisión y constituye un importante factor de riesgo (Pérez-Martín *et al.,* 2000).

En España, los principales focos endémicos se encuentran en la Cordillera Cántabro-astúrica, la Cordillera Ibérica, Cataluña y el foco más importante en la cordillera central compuesta por Guadalajara, Madrid, Segovia, Ávila y Cáceres, además de otro foco situado en los montes de Toledo que penetra también en la provincia de Cáceres.

En el norte del país, Fonseca-Salamanca *et al.* denuncian en 2009, que la especie de *Trichinella* más frecuente en cerdo es *T. spiralis* (100% de los casos analizados), mientras que en el jabalí y zorro es *T. britovi* (67% y 100% de los casos analizados, respectivamente). En Asturias, Cordero del Campillo, denuncia en 1974, especies

silvestres infectadas, donde las incidencias observadas fueron: hurón (25 %), garduña (5,5 %), tejón (40%), jineta (38 %), gato montés (31 %), zorro (30 %), lobo (20-80 %), jabalí (1 %) y rata (2–40 %).

Los resultados de estudios epidemiológicos a nivel nacional (Pozio, 1998), determinan que la prevalencia global en España puede variar según la zona, encontrándose en un rango de 0.08 y 0.48%. En 2011, la European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control citan, en su informe, prevalencias del 0,20% para el jabalí en el periodo 2007-2009, mientras que para el cerdo domestico se ubicaron en el 0,00016%. Las detecciones en zorro (*Vulpes vulpes*) alcanzaron al 4,54% entre los animales analizados en el mismo periodo.

Los resultados son muy variables en cuanto a las detecciones en animales de vida libre en España. Así en Zaragoza, Sánchez Acedo *et al.,* no detectan en 1989 ningún caso positivo a *T. spiralis* tras investigar 180 perros vagabundos, pero si detectaron este parásito en 4 zorros, una gineta, un gato montés y un jabalí.

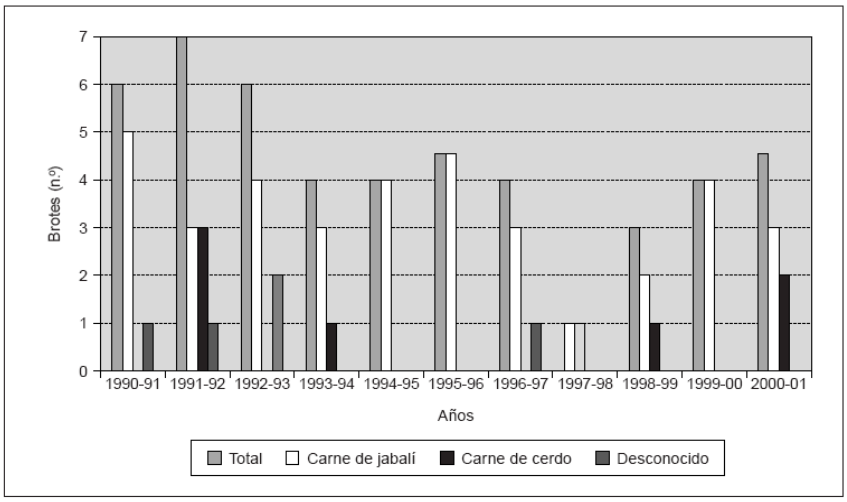
Figura 3. Distribución geográfica de los brotes de trichinellosis detectados en España entre 1990-2001 (Rodríguez de las Parras *et al.,* 2004)

Por su parte, en Córdoba, Calero Carretero *et al.1989*, no encuentran ningún animal parasitado entre las 26 especies de carnívoros, lagomorfos, roedores, insectívoros y quirópteros investigados. Sin embargo, en un águila ratonera (*Buteo buteo*) encuentran larvas musculares no enquistadas, en principio no reconocidas como tal, pero identificadas posteriormente, con los riesgos derivados de los conocimientos

existentes en aquel entonces, como *T. pseudospiralis* (Calero *et al.,* 1987; Calero y Carmona, 1982).

Atendiendo a los requisitos de la normativa comunitaria, hospedadores como los équidos mostraron una seroprevalencia de un 2.3%, a partir de los 85 individuos investigados (Luzón *et al.,* 2009). Las prevalencias en porcino industrial son muy reducidas, no obstante se deben contemplar las reintroducciones e interconexiones con la fauna silvestre (Arroyo-Díaz *et al.*, 2007).

El carácter zoonósico de esta parasitosis se ha manifestado en España con la aparición de varios brotes epidémicos. De los 49 brotes de la enfermedad declarados desde 1990 hasta 2001 (Rodríguez de las Parras *et al.,* 2004) con una media de 5 brotes/año, en el 75,5% de los casos el origen fue el consumo de carne o productos elaborados a partir de jabalíes abatidos en cacerías. En el 14,3% la fuente de infección fue el cerdo criado en granjas domésticas, causando brotes que afectaron a pequeñas comunidades familiares. Finalmente, el 10.2% restante fue de origen desconocido.



72 Enferm Infecc Microbiol Clin 2004;22(2):70-6

Figura 4. Declaración de los brotes de Trichinellosis en España en los años 1990-2001

En estos brotes, la distribución geográfica por regiones coincide con la focalización previamente reconocida por Rodríguez de las Parras *et al*. en 2004 para las cinco áreas principales, destacando el brote declarado en Granada en 2000, con 38 personas afectadas (López Hernández *et al.,* 2001) o en Huesca, en el año 2011, donde una persona falleció por el consumo de carne de jabalí infectada.

En la comunidad autónoma de Extremadura, la alta prevalencia del ciclo doméstico de *T. spiralis* es residual en cerdo doméstico de crianza familiar. Lo más probable es que persista como consecuencia del mantenimiento en animales salvajes, siendo principalmente jabalíes y zorros los animales implicados, actuando como reservorios también de *T. britovi*, que aparece con poca frecuencia en cerdo doméstico.

Pozio *et al.* (1996), nos indican que las especies presentes en Extremadura son *T. britovi* y *T. spiralis*. Estos investigadores sitúan la prevalencia en zorros en el 4,8% (25% *T. spiralis*-75% *T. britovi*). En esta misma línea, en un estudio realizado por Pérez-Martín *et al*. (2000) muestreando zorros y jabalíes abatidos en monterías en Extremadura, nos indican que *T. britovi* se encuentra en el 67% de los zorros positivos (en el 33% restante se aísla *T. spiralis*).

Durante la temporada 2004-2005 el Área de Parasitología de la Universidad de Extremadura realizo un trabajo en el que se recopilaron 223 muestras de tejido muscular de zorros, abatidos en distintas modalidades cinegéticas, en la Comunidad Autónoma de Extremadura. Estas muestras fueron sometidas a digestión pépsica, obteniéndose los siguientes resultados:

	Nº de zorros en estudio	**Nº de casos positivos**	**Prevalencia**
Temporada 2003-2004	**223**	**8**	**3,59 %**

Tabla 2. Resultados de la temporada 2003-2004 referente a zorros.

Si comparamos esta prevalencia con la que se encontró en cerdos y jabalíes durante las temporadas 2003-2004-2005, nos daríamos cuenta de que la prevalencia era muy superior en carnívoros que en los otros dos animales.

	Nº de casos cerdos	Prevalencia cerdos	Nº de casos jabalíes	Prevalencia jabalíes
2003	23	0,068 %	20	**0,13 %**
2004	1	0,0036 %	23	**0,19 %**
2005	1	0,0067 %	9	**0,18 %**
Total	**25**	**0,0032 %**	**52**	**0,16 %**

Tabla 3. Resultados de las temporadas 2003, 2004 y 2005 referente a jabalíes.

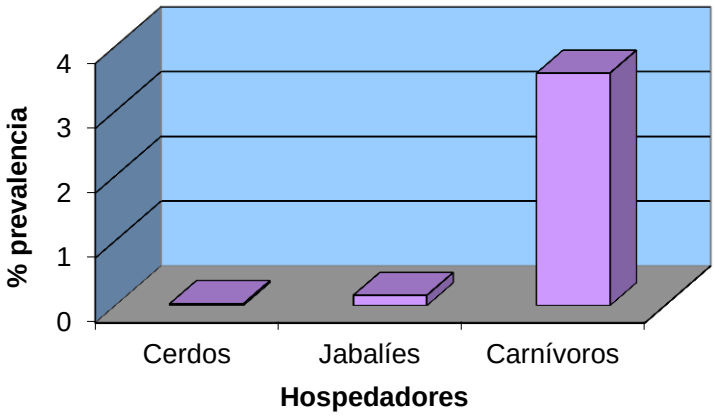


Figura 5. Comparación de la prevalencia de trichinellosis en distintos hospedadores durante los tres últimos años, a excepción del grupo de carnívoros que refleja la prevalencia de un estudio realizado durante la campaña 2004 – 2005.

En cuanto a la distribución en otros países, de 2006 a 2009 se revisaron 108 zorros rojo en Haut-Var (Francia), para valorar la infección por *Trichinella britovi*. La prevalencia encontrada fue de 2,7%, lo cual no indica que el zorro puede ser considerado como un centinela de predicción de *Trichinella* en el ecosistema Haut-Var (Aoun *et al.,* 2012).

En Alemania y Polonia, la alta densidad de población del zorro rojo se considera un riesgo para la salud pública, ya que este cánido salvaje es uno de los principales reservorios de *Trichinella* spp. En 2010 en Polonia, se puso en marcha un programa para monitorear la prevalencia de *Trichinella* spp. en la población de zorro rojo, tras dos años, se detectaron larvas en 44 de 1634 zorros lo que supone un 2,7% de prevalencia. En Alemania, en el período 2002-2011, se encontraron larvas en 27 zorros. Las especies de *Trichinella* detectadas fueron *T. spiralis* en 15 zorros de Alemania (una co-infección con *Trichinella britovi* y una con *Trichinella pseudospiralis*) y en 9 zorros de Polonia, *T. britovi* en 8 y 32 zorros de Alemania y Polonia,

respectivamente, y *T. pseudospiralis* en 1 zorro de Alemania. Además de ello, se encontró *T. nativa en* 3 zorros de Alemania (una co-infección con *Trichinella spiralis*) y en 1 de zorro de Polonia. La detección de *T. nativa* fuera de su área de distribución conocida abre nuevos interrogantes sobre la capacidad de esta especie para colonizar las regiones templadas (Chmurzyńska *et al.,* 2013).

En el año 2015, se llevó a cabo en Rumania un estudio sobre la importancia de los zorros en la transmisión de *Trichinella* spp, en el que se consiguieron muestras cinegéticas de 121 animales pertenecientes a 45 terrenos de caza distintos. Se detectó infección en 26 zorros (21,5%) pertenecientes a 18 de los 45 terrenos (40%). La densidad media de larvas fue de 10,5 larvas por gramo (LPG) y de las 25 muestras analizadas con éxito, 24 fueron identificadas como *T. britovi* (96%) y las larvas de la otra muestra aislada con éxito fueron identificadas como *T. spiralis* (4%). Los presentes resultados revelaron que el zorro rojo debe considerarse como un importante reservorio *T. britovi* en el ciclo silvestre; Por el contrario, la detección de un solo aislado de *T. spiralis* sugiere que los zorros rojos juegan un papel menor en la epidemiología del ciclo doméstico en el área investigada en el oeste de Rumania (Imre *et al.,* 2015).

Entre noviembre de 2008 y marzo de 2010 se realizó un estudio en el norte de Portugal para evaluar la infección en zorros rojos de *Trichinella* spp. Se obtuvieron 47 cadáveres de zorros rojos silvestres abatidos durante la temporada oficial de caza o muertos en accidentes de tráfico. De los 47 zorros tan solo en uno se observó la presencia de *T. britovi,* lo que indica una prevalencia de 2,1%. Esto confirma que el ciclo silvestre está también presente en el norte de Portugal (Lopes *et al*., 2015).

En el año 2013, por primera vez se identificó un zorro positivo a *Trichinella* en Reino Unido, en la localidad de Bristol, en concreto estas larvas fueron identificadas como *T. pseudospiralis* y sugiere la posibilidad de un ciclo de infección existente en la fauna silvestre (Learmount *et al.,* 2015).

En Polonia, entre los años 2010-2015, se recogieron muestras de zorros rojos para determinar la prevalencia de *Trichinella* spp*.,* y a través de la digestión HCl-Pepsina

encontraron larvas en un 10,2% de las muestras examinadas (145/1447). Estas larvas fueron identificadas como *T.spiralis* (11,03%) %), T. britovi (71,72%), y *T. pseudospiralis* (0,69%) (Cybulska *et al*., 2016).

En la región de Abruzzi (centro de Italia) se recogieron muestras entre los años 2004-2010 de distintos animales, de las cuales 218 pertenecieron a lobo, siendo positivas a *Trichinella* 59 de las mismas, mientras que de zorro se recogieron 480 muestras, resultando positivas 24. Todas las muestras aisladas pertenecían a *T. britovi* y a través de este estudio se afirmó que los lobos, al tener la prevalencia más alta, se puede considerar como centinela para la infección de dicho parásito en el área investigada y probablemente en otras regiones de los Apeninos (Badagliacca *et al.,* 2016).

4.7. Hospedadores.

Aunque para el desarrollo de este trabajo hemos empleado muestras de zorros rojos (*Vulpes vulpes*), tejones (*Meles meles*), garduñas (*Martes foina*) y nutrias (*Lutra lutra*). Nos hemos centrado especialmente en el zorro, ya que es del que hemos recibido un mayor número de muestras.

El zorro es un cánido de tamaño mediano y grácil, con el morro alargado y con una franja blanca en su labio superior, las orejas son relativamente grandes, siempre rectas y con la parte posterior oscura. Los ojos son pequeños y la pupila es vertical. El color del pelaje puede variar entre el pardo-rojizo (el más habitual) hasta el gris. Las extremidades son finas y alargadas con respecto al cuerpo, y los pies pequeños. La cola es larga (70% de la longitud del cuerpo) y con pelo largo acabada en punta con un mechón blanco, uno de los rasgos determinantes que permiten identificar a esta especie. Su masa corporal en los adultos se encuentra entre 3 y 14 kg (*Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*).

En España está catalogada como especie cinegética, siendo la caza la causa más importante de mortalidad en estas poblaciones.

Es una de las especies de carnívoros con mayor diversidad ecológica, encontrándola en todo tipo de hábitats naturales, incluso se ha adaptado a vivir en ecosistemas urbanos

o suburbanos.

Los micromamíferos, los lagomorfos y la basura representan en España tres cuartas partes de la biomasa consumida, con mayor consumo de conejo en el Mediterráneo y de pequeños roedores hacia el norte. Otras presas como reptiles, insectos, lombrices, cangrejos de río y peces, además de frutos, completan la dieta del zorro en nuestro país con una importancia relativa en función del tipo de hábitat y la época del año.

Con un único período reproductor al año el zorro es una especie monoéstrica. En las regiones de latitudes medias del hemisferio norte los zorros se reproducen entre diciembre y abril, aunque la mayoría de las cópulas son entre el mes de enero y febrero. El número medio de crías por camada oscila entre 1 y 12.

En su área de distribución, el zorro coincide con varias especies de carnívoros con los cuales solapa sus requerimientos ecológicos. En la Península Ibérica comparte recursos con pequeños carnívoros como el gato montés, la garduña, la jineta y el tejón.

La unidad social básica en el zorro es la pareja, compuesta por un macho y una hembra adultos reproductores, aunque grupos de hasta 6 ejemplares (normalmente un macho adulto junto a un número de 2 a 5 hembras posibles reproductoras) podrían compartir un territorio en función del hábitat. El macho colabora en el cuidado de las crías hasta que estas abandonan la madriguera. La defensa del territorio se realiza mediante una amplia batería de sistemas de marcaje aunque se pueden dar comportamientos agonísticos en los encuentros entre ejemplares de territorios ajenos.

Los ejemplares juveniles abandonan el territorio familiar mediante movimientos de dispersión hasta que encuentran un nuevo territorio.

El período de actividad general se desarrolla por la noche con algunas variaciones debidas a la estación del año y el estado sexual que pueden permitir observar ejemplares activos a plena luz del día.

En cuanto a los otros mamíferos empleados, el tejón tiene un cuerpo robusto con la cabeza pequeña y el cuello muy corto. Presenta un cuerpo alargado y con cola muy corta, con patas fuertes y acabadas en largas y poderosos uñas que le sirven para excavar. El peso es variable, oscilando entre los 4,8 y los 9,8 kg. Puede habitar todo

tipo de ambientes y parece claro que los tejones pueden vivir en lugares muy distintos comiendo diferentes recursos (lombrices, insectos, frutos, pequeños mamíferos, conejos, etc.), pero es también evidente que disponiendo de lombrices de tierra las prefieren sobre otros alimentos.

La garduña es un carnívoro de tamaño medio, de cabeza estrecha, morro afilado, cara en forma de cuña, ojos relativamente grandes y orejas redondeadas. El cuerpo es moderadamente alargado con una cola larga y peluda que usa como un balancín para guardar el equilibrio cuando se mueve o salta entre árboles. Las extremidades son cortas. Los machos tienen una masa corporal media de 1.353 g y las hembras 1.057 g. Es un carnívoro generalista y muy adaptable. La dieta de la garduña presenta un amplio espectro de presas (mamíferos, aves, frutos, insectos y reptiles) y una adaptación a la disponibilidad local de alimento mostrando así su carácter de depredador oportunista con una dieta generalista.

La nutria tiene un cuerpo alargado y extremidades proporcionalmente cortas y robustas. Orejas muy pequeñas, casi ocultas bajo el pelo. La cola es ancha y aplanada en la base, y algo puntiaguda en su extremo. Posee cinco dedos unidos por una membrana interdigital bien desarrollada en manos y pies. La masa corporal oscila entre 6,1 - 9,4 kg en los machos y 4,4 – 6,5 kg en las hembras. La nutria es una especie propia de ecosistemas acuáticos, encontrándosela desde el litoral hasta la alta montaña. Se encuentra en ríos, arroyos, lagos, lagunas, marismas y cualquier lugar con presencia de agua. Es una especie principalmente consumidora de peces que captura también importantes cantidades de cangrejos, anfibios, reptiles y, en ocasiones si no dispone de los anteriores, insectos, aves o mamíferos.

5. Material y métodos.

5.1. Procedimiento laboratorial general.

Para conseguir los objetivos propuestos e indicados en la introducción, hemos realizado una serie de procedimientos que están ordenados de manera secuencial a continuación:

El trabajo comienza con la recepción de muestras de mesocarnivoros procedentes de Salamanca, Ávila, Zamora y Valladolid, las cuales son recogidas a partir de actividades cinegéticas por un veterinario que colabora con nosotros. Estas muestras han sido recogidas desde el 16 de junio de 2016 hasta el 30 de mayo de 2017. Dichas muestras son enviadas correctamente envasadas a una temperatura de refrigeración para que no pierdan sus características. A continuación, esta muestras son procesadas en el Área de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, con el fin de estimar la prevalencia de *Trichinella spp*. en los carnívoros anteriormente descritos. Durante este proceso se debe complimentar la ficha correspondiente a cada muestra, en las que se especifica el número de muestra, la procedencia, fecha de recogida, sexo y edad, lo cual nos permite tenerlas correctamente identificadas. Estas muestras se someten a una digestión artificial ácido-pépsica según el reglamento europeo (Reglamento de ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015, por el que se establecen "normas específicas para los controles oficiales de la presencia de "triquinas" en la carne).

Antes del proceso de digestión se rellena una ficha con los datos de la muestra, indicando la procedencia y el número de registro que le asignamos en el Área de Parasitología, con el fin de completar la ficha al final del proceso con los resultados obtenidos.

Parasitología
Facultad Veterinaria (UEX)

Digestión artificial para el diagnóstico de Trichinella spp.

Fecha	Nº registro sanidad	Nº registro parasitología

Tipo de muestra cárnica (músculo)	Gramos de muestra utilizados

Aparataje	Reactivos (indicando la concentración de cada uno)
- - - - - - - -	- - - - - - - -

Verificación báscula			Verificación temperatura		
1 g	10 g	100 g	Inicio	15'	30'

Tiempo de digestión	Restos de carne sin digerir	Larvas L1 recuperadas

Incidencias / Observaciones

Análisis y lectura de resultados:	Realización y transcripción:
Fdo.:	Fdo.:

Figura 6. Ficha correspondiente a la digestión artificial para el diagnóstico de *Trichinella* spp.

El número de gramos digeridos por animal es de 25 gr, haciendo digestiones en masa de 100 gr. De tal forma, que si el resultado es negativo, los cuatros animales se consideran negativos a *Trichinella.* Si por el contrario el resultado es positivo, realizamos una digestión individualizada de cada animal, hasta determinar cuál o cuáles de los 4 carnívoros son positivos.

Una vez que ha terminado la digestión artificial, observamos en un estereomicroscopio las muestras obtenidas, de modo que se realiza un cálculo de la carga parasitaria (en caso de que la muestra sea positiva) y se procede al contaje de las larvas obtenidas. Este contaje se puede realizar directamente sobre la muestra si la cantidad de larvas no es muy grande, o bien se pueden realizar diluciones en aquellas parasitaciones intensas, para ello necesitamos usar cámaras de McMaster.

El producto obtenido se traslada a un vial, y si fuera necesario, para retirar el exceso de agua se deja sedimentar, a fin de mezclar con alcohol absoluto la mayor concentración posible de larvas, las cuales serán finalmente enviadas al "Internacional *Trichinella* Reference Centre" de Roma para su especiación, mediante técnicas de PCR.

5.2. Muestras de estudio.

Las muestras utilizadas en este estudio corresponden a zorros rojos (*Vulpes vulpes*) (n=712), tejones (*Meles meles*) (n=11), garduñas (*Martes foina*) (n=11), jinetas (*Genetta genetta*) (n=1) y nutrias (*Lutra lutra*) (n=1), todas ellas proceden de cuatro provincias de la región de Castilla y León.

La edad de los animales muestreados se determina a través de la necropsia de los mismos, en concreto a partir de un examen de las piezas bucales de forma que:

- A las 2-3 semanas de edad: salen los incisivos y caninos superiores.
- A las 3-4 semanas de edad: aparecen los incisivos y caninos inferiores.
- A los 2-3 meses: enrasamiento de las piezas inferiores.
- A los 4 meses: se reemplazan las pinzas inferiores.
- A los 4 meses y medio: se reemplazan los medianos.
- A los 5 meses: se sustituyen los extremos y caninos inferiores.
- Entre los 6 y 7 meses: aparecen los molares permanentes.
- Del 7º a 12º mes: cambian los caninos y todos los incisivos posteriores, finalizando el proceso de erupción.
- Entre los 12 y 18 meses: rasan las piezas inferiores y comienza el desgaste de los medianos inferiores.
- Entre los 36 y 42 meses: rasan las pinzas superiores.
- Entre los 4 y 4,5 años: rasan los medianos superiores y, por tanto, toda la arcada incisiva. Los colmillos aparecen amarillentos.
- A partir de los 5,5-6 años: todos los incisivos, superiores e inferiores están rasados, con desgaste creciente y acortamiento progresivo.
- A los 6 años: desaparece el lóbulo central de los extremos de la mandíbula superior.
- A los 7 años: la superficie de las pinzas de la mandíbula inferior se hace ovalada y los colmillos pierden su punta afilada.
- A los 8 años: los medianos inferiores presentan superficie oval y la superficie de rozamiento de las pinzas inferiores se proyecta hacia el exterior.
- Entre los 9 y 10 años: se hace ovalada la superficie de las pinzas superiores.

- Entre los 10 y 12 años: caen las pinzas inferiores
- Entre los 12 y 16 años: caen todos los incisivos
- Entre los 16 y 20 años: caen los colmillos.

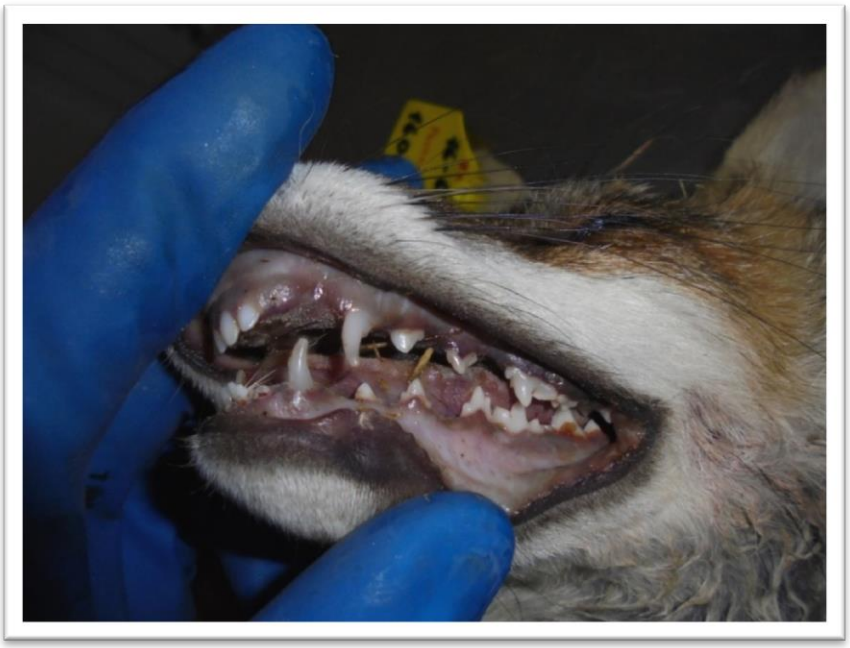


Figura 7. Determinación de la edad del animal a través de las piezas dentales.

En esta misma sala de necropsias se obtienen las muestras musculares del animal, siendo los músculos flexor y extensor de antebrazo y cuádriceps frontal y femoral los elegidos, con los que realizaremos la digestión artificial, a partir de la cual podremos obtener el número de larvas de *Trichinella* presentes en caso de que el resultado sea positivo.

Figura 8. Toma de muestras en sala de necropsia.

5.3. Método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético.

Las muestras se someten al proceso de digestión artificial ácido-pépsica según el reglamento europeo Reglamento de ejecución (UE) 2015/1375 adaptado a nuestro laboratorio. A través de este método, conseguimos digerir muestras de carne de forma artificial, simulando la digestión del estómago, con la finalidad de liberar las larvas 1 presentes en la muestra de carne, para posteriormente visualizarlas al microscopio.

Relación de material utilizado:

- Un cuchillo o tijeras y pinzas para cortar las muestras.
- Placas de petri en las que introducimos 100 gramos de carne conseguidos a partir de 25 gramos de muestra pertenecientes a 4 animales diferentes.
- Una picadora (MOULINEX) para conseguir que las muestras queden lo suficientemente picadas para que el proceso de digestión pueda realizarse adecuadamente.

Figura 9. Picadora "MOULINEX".

- Agitadores magnéticos (OVAN-Microheat) provistos de una placa térmica de temperatura controlada y barras recubiertas de Teflón de 5 cm, aproximadamente.
- Embudos de separación cónicos de vidrio de una capacidad de 2 litros como

mínimo, preferiblemente provistos de llaves de seguridad de Teflón, con un diámetro mínimo de 12 cm en la parte superior.

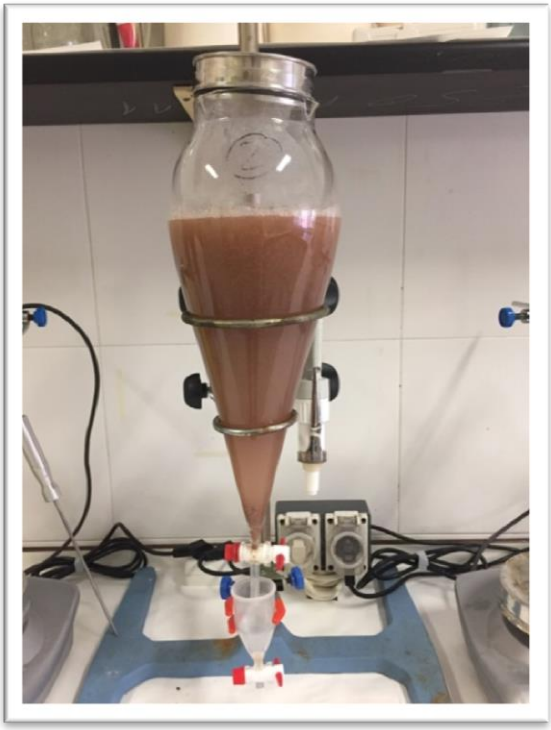


Figura 10. Embudo.

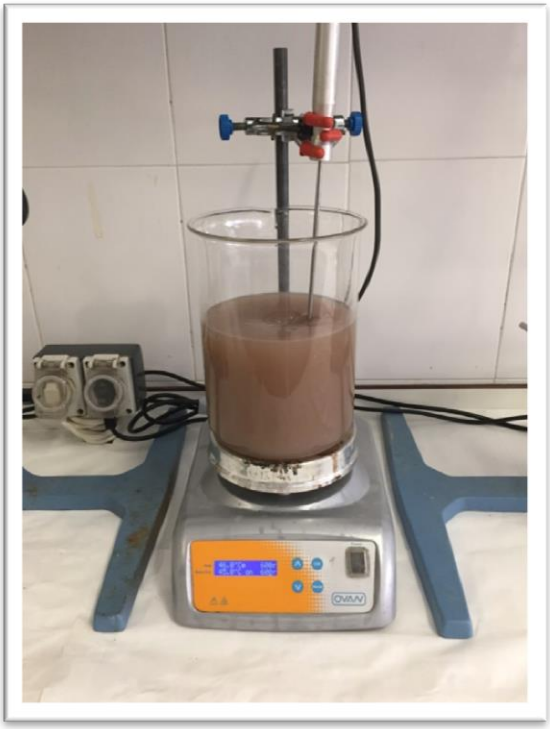


Figura 11. Agitador magnético con un vaso de precipitado de vidrio con capacidad de 3 Litros.

- Soportes con anillos y fijaciones.
- Tamices con una malla de 180 micras de diámetro de poro y un diámetro exterior de 11 cm, provistos de una rejilla de acero inoxidable.

Figura 12. Tamiz.

- Vasos de precipitados de vidrio de una capacidad de 3 litros.
- Un segundo embudo de 50 ml provisto de una llave de seguridad.
- Un estereomicroscopio (NIKON SMZ1500), con una fuente de luz de intensidad regulable bajo la platina con aumentos 20-100x.
- Placas de petri (para su uso con el estereomicroscopio) de un diámetro de 9 cm cuyo fondo se haya dividido en cuadrados de 10 × 10 mm .
- Hoja de aluminio.
- Ácido clorhídrico de 25 %.
- Pepsina con una concentración de 1:10 000 NF (US National Formulary), correspondiente a 1:12 500 BP (British Pharmacopoeia) y a 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie).
- Agua del grifo calentada a una temperatura de 46 a 48 °C.
- Una balanza cuya precisión sea de al menos 0,1 g.
- Cubeta de plástico de 10 a 15 l de capacidad para recoger el jugo digestivo restante.
- Pipeta (DISCOVERY CONFORT).

Figura 13. Pipeta (DISCOVERY CONFORT).

- Un termómetro de una precisión de 0,5 °C con una graduación de 1 a 100 °C.

De acuerdo al Reglamento de ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015, el procedimiento para digestiones en masa de 100 gr es el siguiente:

- Añadir 16 ± 0,5 ml de ácido clorhídrico a un vaso de precipitados de 3 l que contenga 2 l de agua del grifo, calentada a una temperatura de 46 a 48 °C; se coloca un agitador en el vaso y se comienza a agitar.
- Añadir 10 ± 0,2 g de pepsina.
- Triturar en el mezclador 100g de muestras, en nuestro caso utilizamos 25 g de 4 muestras distintas para aligerar el proceso.
- Llevar la carne picada al vaso de precipitados de 3 l que contenga el agua, la pepsina y el ácido clorhídrico.
- Introducir varias veces el dispositivo de triturado del mezclador en el líquido de digestión del vaso de precipitados y enjuagar la taza del mezclador con una pequeña cantidad de líquido de digestión para quitar la carne que aún esté adherida.
- Cubrir el vaso de precipitados con una hoja de aluminio.
- Deberá regularse el agitador magnético, de tal forma, que durante su funcionamiento mantenga una temperatura constante de 44 a 46 °C. Durante la agitación, el líquido de digestión deberá girar a una velocidad suficiente para que se forme un remolino profundo sin salpicaduras.
- Agitar el líquido de digestión hasta que desaparezcan las partículas de carne (durante 30 minutos aproximadamente), en nuestro caso lo mantenemos hasta 45 minutos. Detener el mezclador y verter el líquido de digestión a través del tamiz en el embudo de separación.
- Se considera satisfactorio el proceso de digestión si no permanece más del 5 % del peso de la muestra inicial en el tamiz.
- Dejar el líquido de digestión en el embudo durante 30 minutos.
- Después de 30 minutos, traspasar rápidamente una muestra de 40 ml del líquido de digestión a un embudo de decantación de 50 ml.
- Mantener los líquidos de digestión y otros residuos líquidos en una bandeja

hasta que se haya completado la lectura de los resultados.

- Dejar reposar la muestra de 40 ml durante 10 minutos. Luego, aspirar con cuidado 30 ml de líquido sobrenadante para retirar las capas superiores y dejar un volumen que no supere 10 ml.
- La muestra de 10 ml del sedimento restante se verterá en una placa de petri.
- Enjuagar el embudo de decantación con 10 ml como máximo de agua del grifo, que se agregará a la muestra. Luego, proceder a la observación en el estereomicroscopio con un aumento de 15 a 20 veces. Siempre que se observen zonas sospechosas o formas similares a parásitos, deberán aplicarse aumentos superiores, de entre 60 y 100 veces.

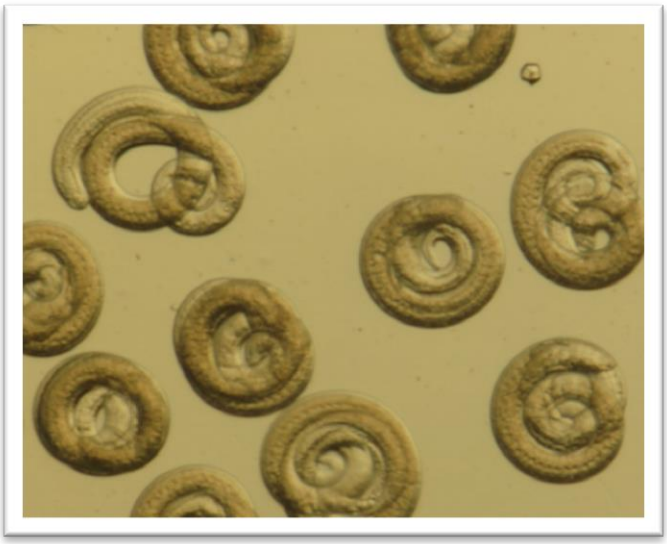


Figura 14. Larvas de *Trichinella* observadas con el estereomicroscopio

- Los líquidos de digestión se examinan desde el momento en que estén dispuestos. En ningún caso se pospuso el examen al día siguiente.

5.4. Estimación de la carga parasitaria.

En todos los casos positivos se llevó a cabo el recuento de larvas obtenidas, a fin de estimar el número de larvas por gramo (LPG) en la muestra de tejido muscular.

Este recuento se realiza utilizando una placa de petri de fondo cuadriculado, mediante la observación por el estereomicroscopio a 30 aumentos. El número de larvas obtenidas se dividen por el número de gramos de muestra utilizado, para de este modo obtener el número de larvas por gramo (LPG).

Si el número de larvas fuese superior a 200 L1, el contaje sería muy complicado de realizar, por lo que se procede al contaje proporcional para estimar el número total de larvas. Para ello, se realiza midiendo los mililitros de residuo de la digestión donde están las L1 y los introducimos en un tubo “Falcon”, posteriormente añadimos líquido PBS hasta llegar a un volumen de 40-50 ml. Desde el tubo “Falconer” llenamos una cámara “McMaster” con ayuda de una pipeta Pasteur y procedemos a hacer el recuento de los L1 observadas, este proceso lo repetimos 3 veces, por lo que haremos recuentos en 6 rectángulos, ya que cada cámara “McMaster” tiene 2 receptáculos cada una. Una vez finalizado el recuento, obtendremos 6 contajes diferentes, de los cuales eliminamos los que estén fuera de rango, quedándonos con cuatro como mínimo, que serán con los que realizamos la media aritmética.

La media obtenida se multiplica por el volumen examinado (volumen total que contenía el tubo “Falconer”) y por 6,66 (factor de corrección), dándonos el número total de larvas que hay en la muestra de carne. Por último, lo dividimos entre el peso de ésta en gramos, obteniendo finalmente el número de LPG.

5.5. Tipificación genética.

La tipificación de los distintos aislamientos se realizó mediante análisis multiplex-PCR (Zarlenga *et al*., 2001) en el ITRC (Instituto Superiore di Sanita de Roma). Las muestras remitidas consistieron inicialmente en larvas viables obtenidas tras la digestión artificial. Se conservan en tubos “Eppendorf”, en alcohol etílico absoluto y PBS a -20 °C hasta su remisión al laboratorio citado.

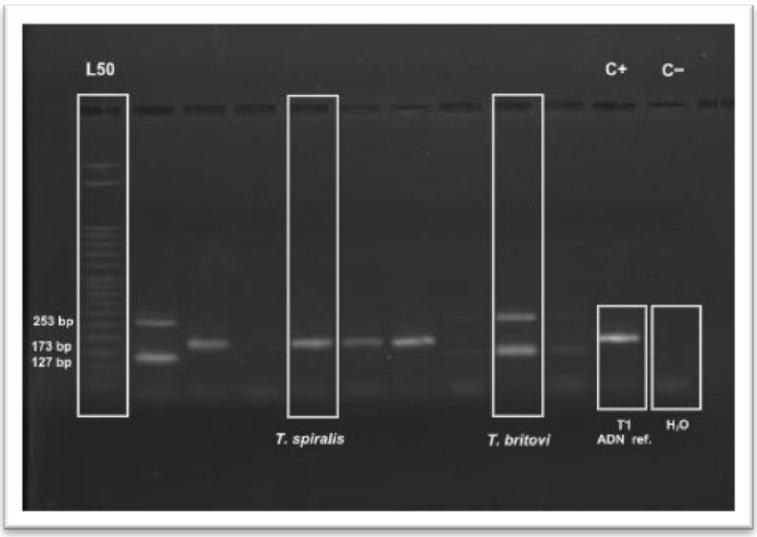


Figura 15. Ejemplo de resultado de la tipificación genética a través del análisis multiplex-PCR en el ITRC.

6. Resultados y desarrollo

6.1. Prevalencia global de *Triquinella* spp.

Tras el análisis de las 736 muestras recibidas, 6 muestras resultaron positivas a *Trichinella* spp., siendo todas ellas pertenecientes a zorros, mientras que el resto fueron negativas, mostrando así una prevalencia global del 0.82% para el zorro rojo.

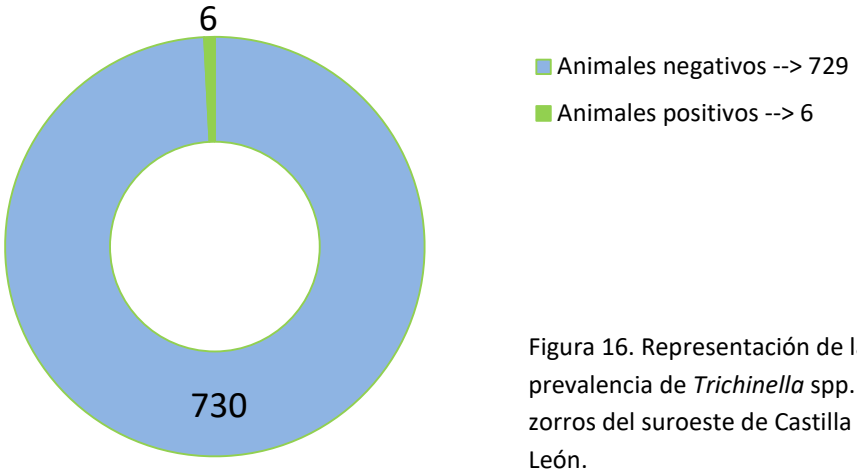


Figura 16. Representación de la prevalencia de *Trichinella* spp. en zorros del suroeste de Castilla y León.

6.1.1 Prevalencia según sexo y edad.

De todas las muestras recibidas, 342 corresponden a hembras, mientras que 386 corresponden a machos, estando este valor bastante igualado entre ambos sexos.

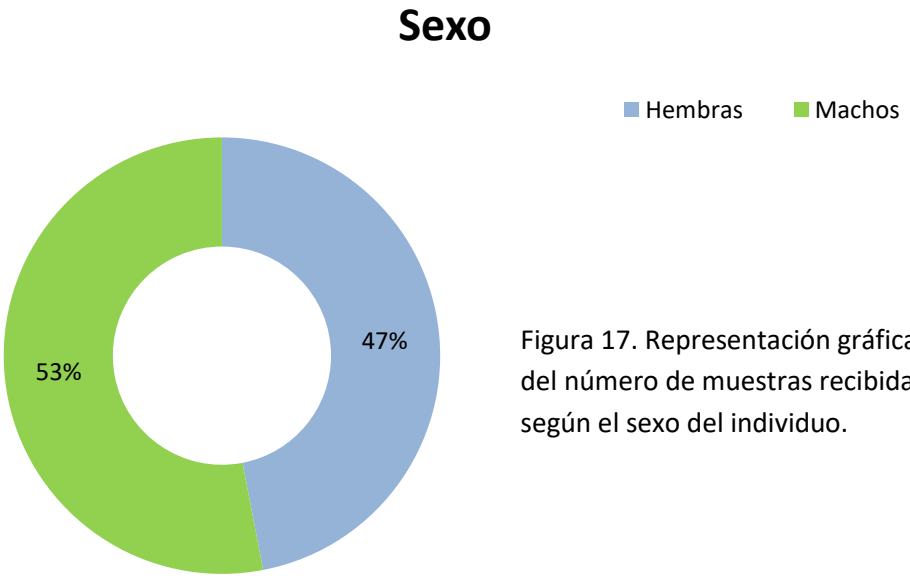


Figura 17. Representación gráfica del número de muestras recibidas según el sexo del individuo.

En cuanto a las muestras positivas, cinco de los seis animales han resultado ser

machos. De este modo, obtenemos una prevalencia de 1.2% en los machos y de 0.29% en las hembras.

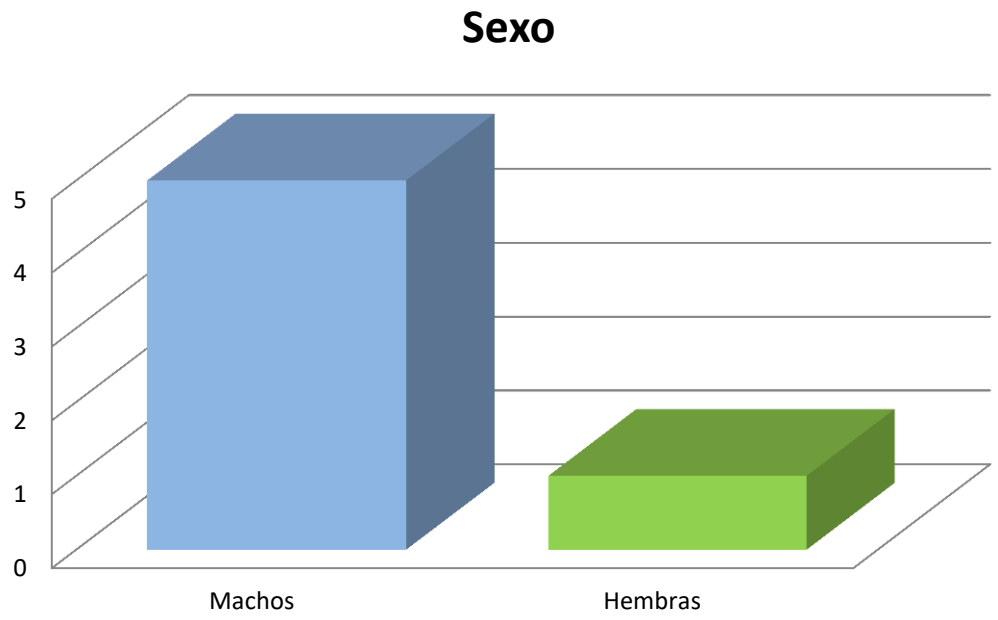
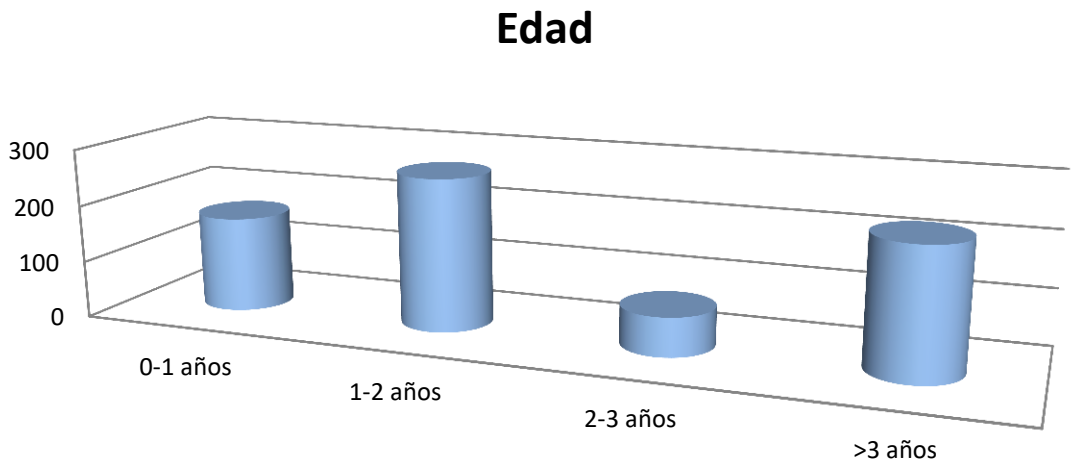


Figura 18. Representación gráfica del sexo de los individuos identificados como positivos.

Con respecto a la edad de todos los animales considerados en el estudio, podemos afirmar la edad media ha sido de 2,7 años, mientras que la edad que más se repite entre ellos es de 2 años.



	0-1 años	1-2 años	2-3 años	>3 años
Edad	168	268	68	223

Figura 19. Representación gráfica del número de muestras recibidas según la edad de los animales.

En cuanto a los animales muestreados que han resultado positivos, según la edad hemos obtenido que 2 animales tienen 5 años, 2 animales tienen 2 años, 1 animal tiene 1 año y por ultimo otro animal tiene 7 meses.

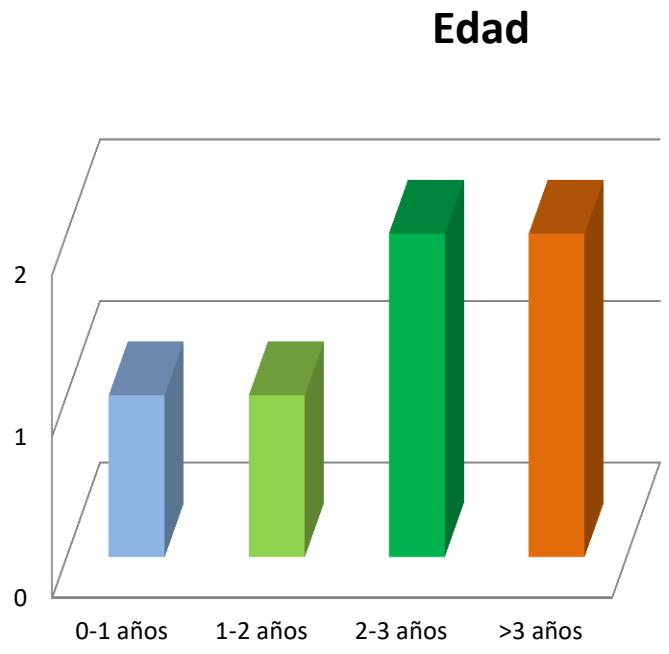


Figura 20. Representación gráfica de la edad de los animales identificados positivos frente a *Trichinella.*

Las prevalencias que obtendríamos por edades seria de 0,58% para zorros rojos de 0-1 años, 0,37% para zorros rojos de 1-2 años, 2,9% para zorros rojos de 2-3 años y por ultimo 0,89% para zorros rojos de >3 años.

6.2 Distribución geográfica.

Como indicamos anteriormente, las muestras recibidas proceden Castilla y León y en concreto hemos recibido 32 muestras de Ávila, 495 de Salamanca siendo la provincia con mayor número de muestras, 37 de Valladolid y por ultimo 171 de Zamora.

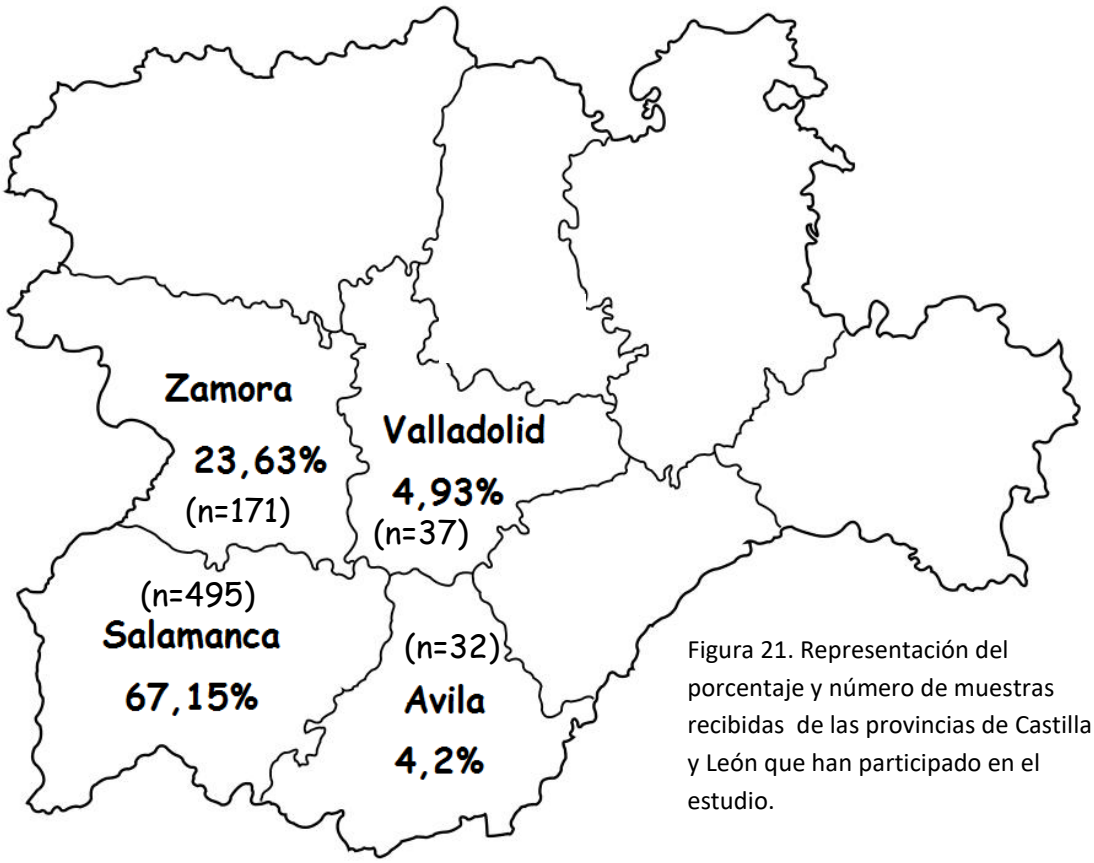


Figura 21. Representación del porcentaje y número de muestras recibidas de las provincias de Castilla y León que han participado en el estudio.

En concreto, los casos positivos que hemos detectado pertenecen a Villar del Buey (Zamora) cuya altitud es de 742 msnm (metros sobre el nivel del mar), 2 muestras a Valdemierque (Albusejo, Salamanca) con una altitud de 936 msnm, 2 muestras a Miranda del Castañar (Salamanca) con una altitud de 649 msnm y por último a Gallegos de Argañan (Salamanca) cuya altitud es de 664 msnm.

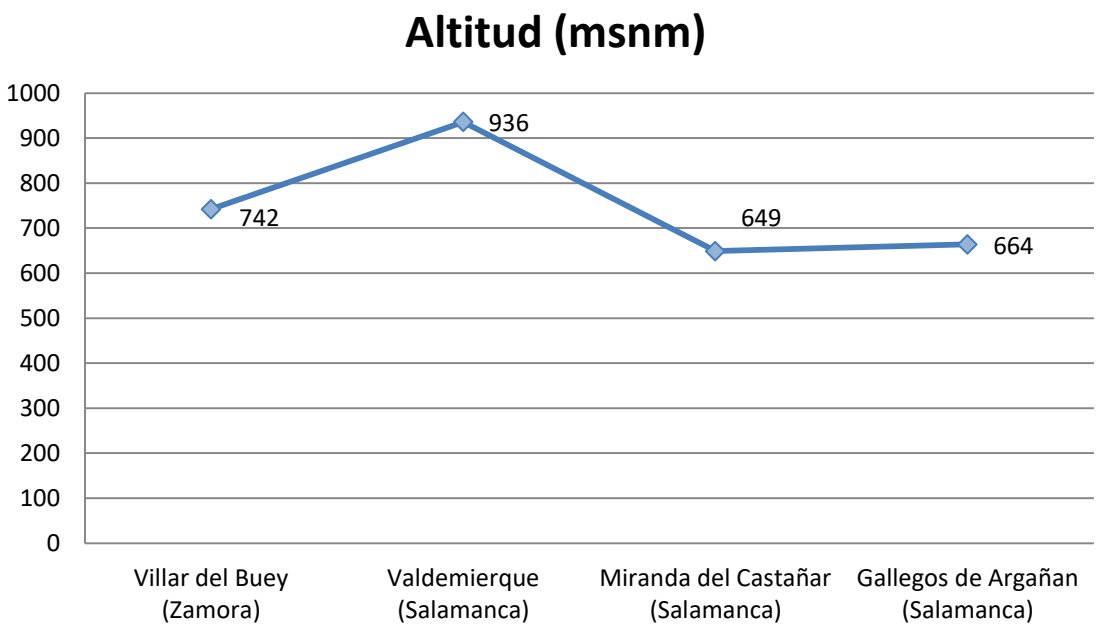


Figura 22. Representación gráfica de la altitud de los distintos municipios donde hemos detectado casos positivos.

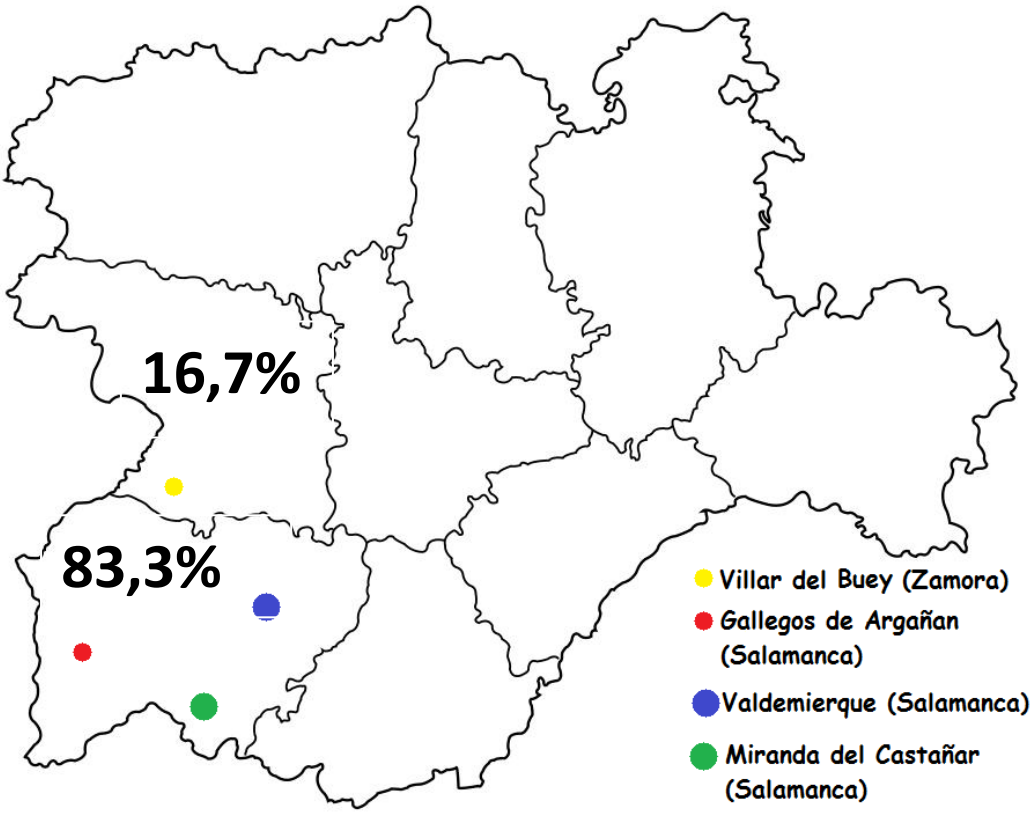


Figura 23. Representación del número de muestras positivas detectadas en cada provincia de Castilla y León, así como el porcentaje de casos positivos.

Las prevalencias obtenidas en cada provincia han sido de 1,01% en Salamanca y de 0,58% en Zamora, no obteniendo ningún resultado positivo en el resto de provincias.

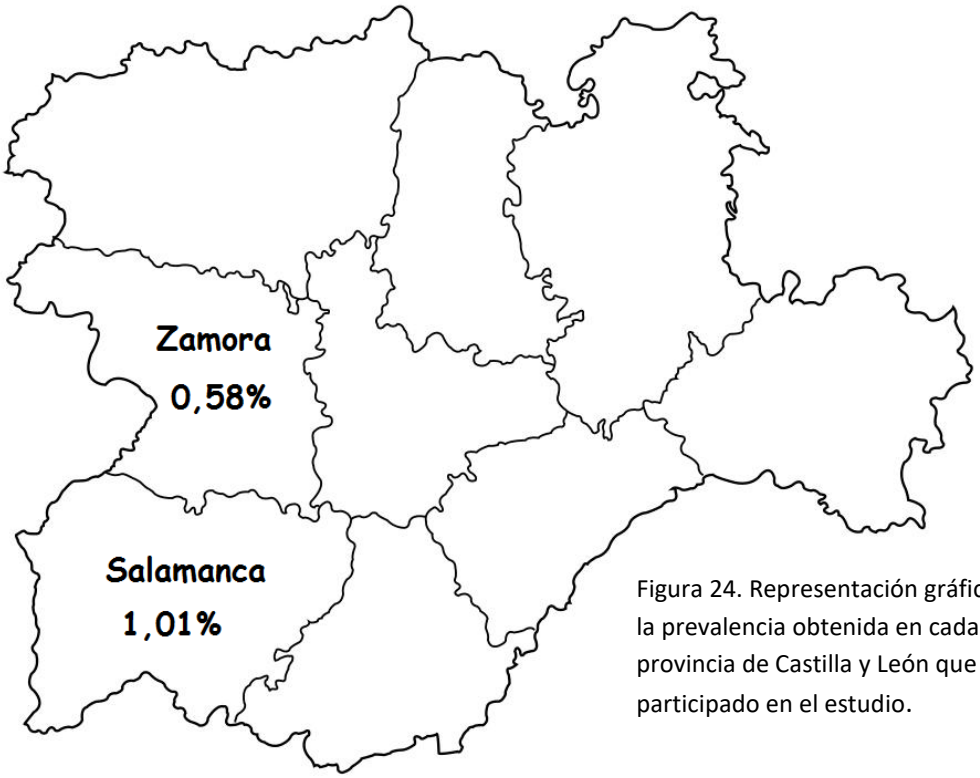


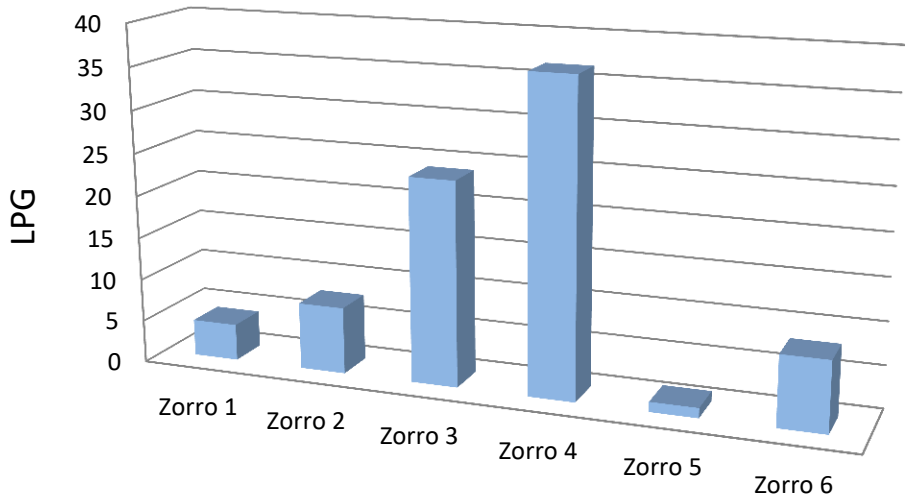
Figura 24. Representación gráfica de la prevalencia obtenida en cada provincia de Castilla y León que han participado en el estudio.

6.3 Carga parasitaria y especiación.

Zorros (positivos)	Edad	Sexo	Procedencia	Altitud	Nº de larvas por gramo	Especie identificada
Zorro 1	5.5 años	Macho	Villar del Buey (Zamora)	742 msnm	4,3 LPG	*T. britovi*
Zorro 2	5.5 años	Hembra	Valdemierque (Salamanca)	936 msnm	7,9 LPG	*T. britovi*
Zorro 3	7 meses	Macho	Valdemierque (Salamanca)	936 msnm	24,0 LPG	*T. britovi*
Zorro 4	2 años	Macho	Miranda del Castañar (Salamanca)	649 msnm	36,6 LPG	*T. britovi*
Zorro 5	2 años	Macho	Gallegos de Argañan (Salamanca)	664 msnm	1,2 LPG	*T. britovi/ T. spiralis*
Zorro 6	1 año	Macho	Miranda del Castañar (Salamanca)	649 msnm	8,3 LPG	*T. spiralis*

Tabla 4. Información epidemiológica sobre las muestras positivas detectadas.

En concreto, en estos 6 casos positivos, el número de larvas por gramo fue de 4,3; 7,9; 24,0; 36,6; 1,2 y 8,3; siendo la media de larvas por gramo encontradas de 13,7.



	Zorro 1	Zorro 2	Zorro 3	Zorro 4	Zorro 5	Zorro 6
Larvas por gramo	4,3	7,86	24	36,63	1,18	8,3

Figura 25. Representación gráfica del número de larvas por gramo LPG de cada zorro.

Como se indicó anteriormente, la especie dominante en los carnívoros presentes en Castilla y León es *T. britovi*, presentándose en 4 de las muestras. Otra de las muestras presenta una infección mixta de *T. britovi/T. spiralis* y la última muestra detectada es de *T. spiralis.*

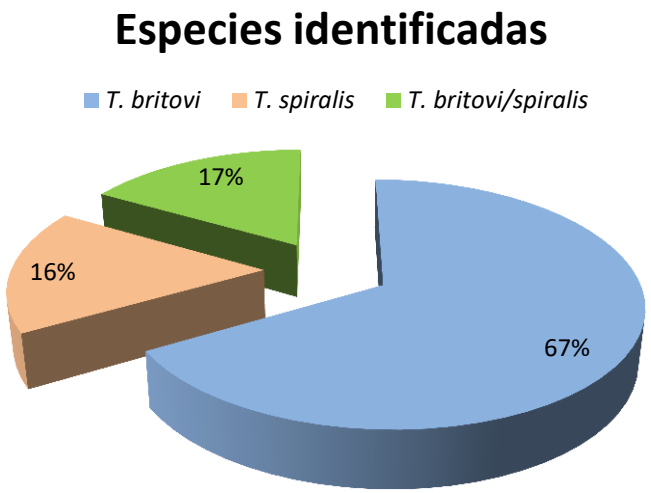


Figura 26. Representación gráfica de las distintas especies de *Trichinella* identificadas por el Instituto Superiore di Sanita de Roma (ITRC)

7. Discusión.

7.1 Prevalencia global de *Trichinella* en zorro rojo.

La prevalencia global de Trichinellosis en el zorro rojo en las 4 provincias estudiadas de la Comunidad Autónoma de Castilla y León es de 0,82%. Este valor es similar al obtenido en Cataluña establecido por López-Olvera *et al*. en 2011 (0,30%), pero en gran medida está en desacuerdo con las tasas más altas que se encuentran en otros territorios españoles como Extremadura (2,64% y 3,59%, Pérez Martín *et al*, 2000, 2007), Guadalajara (8,95%, Criado-Fornelio *et al*., 2000) y Soria (15,5%, Lledó *et al*., 2015). La altitud media de la provincia de Soria es de 1019,25 mnsm y la de Guadalajara es de 1019,05 mnsm, altitudes medias más elevadas que las registradas en Salamanca y Zamora, donde hemos encontrado los casos positivos. Este podría ser el motivo de porque en Guadalajara y Soria el número de casos positivos es mayor, ya que la presencia de *Trichinella* suele estar ligada a la altitud, tal y como afirmo Pozio en 1998, estableciendo que los valores más altos de prevalencia se asocian históricamente a más de 500 m sobre el nivel del mar y se reducen cuando otros recursos (cultivos, árboles frutales y abundancia de ganado como aves y ovejas) están disponibles para los zorros, proporcionándoles una dieta complementaria distinta de las principales fuentes de *Trichinella*.

En el Norte de Portugal entre noviembre de 2008 y marzo de 2010, se detectó una prevalencia de 2,1% en los 47 zorros muestreados (Lopes *et al*., 2015). En cuanto a los estudios realizados en Europa, se constatan diferencias en los datos de prevalencia de *Trichinella* spp. con respecto a nuestro estudio. De esta forma (Aoun *et al*., 2012) detectan una prevalencia de 2,7% en zorros de Francia entre los años 2006 y 2009. Esta misma prevalencia de 2,7% se detecta en Polonia en el año 2010, tras un estudio sobre 1634 zorros (Chmurzyńska *et al*., 2013), lo cual se asemeja a los estudios realizados en Portugal y Extremadura. Esto puede ser debido principalmente a que estas zonas cuentan con una orografía bastante similar, siendo la altitud media más elevada que en la zona analizada por nosotros.

Por otro lado, en otros estudios realizados por Europa, se encuentran resultados aún

mayores a los obtenidos por nosotros. Es el caso, por ejemplo, de un estudio realizado en Rumania en el año 2015, donde obtuvieron una prevalencia del 21,5% tras el análisis de 121 zorros (Imre *et al*., 2015). Esta prevalencia tan elevada se debe principalmente a que en Rumania el sistema sanitario es más deficiente que en el resto de países. En otra zona de Polonia, también se obtuvo una prevalencia elevada, del 10,2% entre los años 2010-2015, tras el estudio de 1447 zorros (Cybulska *et al*., 2016), esto contrasta con el estudio realizado también en Polonia 3 años antes por Chmurzyńska *et al*., 2013, lo cual señala las diferentes prevalencias que pueden existir dependiendo de la zona estudiada en un mismo país. En Italia, en concreto en la región de Abruzzi (Badagliacca *et al.,* 2016) encuentran una prevalencia del 5% tras el análisis de 480 muestras de zorro, siendo esta zona bastante boscosa, a diferencia de nuestra zona de estudio.

En cuanto a los demás animales analizados en el estudio, como ya hemos visto, no hemos obtenido ningún resultado positivo a *Trichinella.* Sin embargo, en otras zonas de Europa esto no es así, por ejemplo en Polonia en el año 2012 (Moskwa *et al*., 2012) detectaron larvas de *T. birtovi* en una marta y un tejón encontrados muertos tras un accidente de tráfico. Además, afirman que estas larvas se encuentran en uno de cada siete tejones. En Italia (Remonti *et al*., 2005) demostraron un prevalencia del 4,3% en garduñas y del 1,8% en tejones en el año 2005. También en otras zonas del mundo, como en Japón, podemos encontrar la presencia de *Trichinella* en carnívoros, ya que (Kobayashi *et al*., 2007) detectaron entre los años 2003 y 2006 casos positivos en distintos animales, entre los que se encontraban mapaches (*Procycon lotor*), visones (*Mustela vison*), martas (*Martes melampus*), comadrejas (*Martes sibirica coreana*) y por último, el tejón. Todo lo anterior nos indica, que aunque en nuestro estudio únicamente hemos obtenido resultados positivos de *Trichinella* en zorros rojos, el resto de carnívoros muestreados también pueden ser portadores de este parásito y participar en el ciclo epidemiológico del mismo. La explicación más razonable sobre porque no hemos obtenido ningún caso positivo en estos animales, es que contamos con un numero de muestras demasiado escaso como para sacar una conclusión al respecto.

En cuanto a la distribución geográfica, comprobamos que el mayor número de casos positivos proviene de la provincia de Salamanca seguida de Zamora. Por el contrario, no hemos obtenido ningún caso positivo de las provincias de Ávila y Valladolid. Esto es debido principalmente al número de muestras recibidas de cada provincia, siendo el 67,15% de muestras recibidas de Salamanca y el 23,63% de Zamora, dejando un porcentaje muy pequeño a las dos provincias restantes, siendo un 4,2% de las muestras recibidas de Ávila y un 4,93% de Valladolid; por lo cual, no podemos afirmar que en estas zonas no este instaurado este parásito.

7.1.1 Prevalencia según sexo y edad.

Respecto a la influencia del sexo en la prevalencia de *Trichinella spp.*, tenemos muy pocos resultados positivos como para poder afirmar que se presenta normalmente de forma más frecuente en machos que en hembras, y además, atendiendo a la bibliografía comprobamos que no existen diferencias significativas entre ambos géneros. Aun así, es cierto que podemos notar una cierta tendencia a una prevalencia mayor en los machos que en las hembras. Esto podría deberse a la necesidad de los machos jóvenes de abandonar el territorio familiar, lo que se traduce en un mayor movimiento por distintas zonas, siendo más fácil la posibilidad de alimentarse de residuos urbanos, acceder a más carroña o tener una mayor depredación.

En relación a la edad, seguimos teniendo una cantidad escasa de resultados positivos, pero en este caso, sí que podemos evidenciar una tendencia de que a mayor edad, la probabilidad de contagio es mayor, debido principalmente a que aumentan los episodios de predación y, por tanto, hay mayor exposición a carnes positivas, siendo mayores las posibilidades de ingerir carne infectada.

7.2 Distribución geográfica

En cuanto a la distribución geográfica de las muestras positivas obtenidas, hay que destacar que todas ellas pertenecen a zonas de secano, estando únicamente una de ellas, la de Miranda del Castañar (Salamanca) en una zona boscosa, perteneciente a las estibaciones del Sistema Central y en concreto, a la “Peña de Francia”. También es de interés indicar que hay dos muestras que se encuentran bastante próximas a la

frontera con Portugal, una de ellas es la muestra perteneciente a Villar del Buey (Zamora) que se encuentra a apenas 25 km de distancia y la otra es la muestra perteneciente a Gallegos de Argañán (Salamanca) que se encuentra cerca de los 20 km de distancia.

7.3 Carga parasitaria y especiación.

Atendiendo a las cargas parasitarias obtenidas, el número medio de larvas por gramo ha sido de 13,71 LPG. Esta media carga parasitaria ha sido observada también por otros autores como Pérez-Martín *et al*. (2000) en Extremadura o Imre *et al.,* (2015) en Rumania donde detectaron una carga media de 10,5 LPG.

Hay que indicar que la carga parasitaria en los carnívoros siempre suele ser más baja que en los jabalíes, por lo tanto, necesitamos digerir más gramos de carne para aumentar la sensibilidad, especialmente en estudios epidemiológicos.

Hemos identificado dos especies de *Trichinella* spp., las cuales son *T. britovi* y *T. spiralis,* además de una infección mixta de ambas especies. La especie dominante ha sido *T. britovi*, presente en el 67% de los casos positivos (4 animales), seguida de *T. spiralis* presente en el 16,5% de los casos (1 animal), similar a la infección mixta entre *T. britovi/T. spiralis* también presente en el 16,5% de los casos (1 animal). Estos datos coinciden con los expuestos por Pérez-Martín *et al*. (2000), donde tras un muestreo de zorros y jabalíes abatidos en monterías en Extremadura, nos indican la presencia de *T.britovi* en el 67% de los casos, mientras que 33% restante se corresponde a *T. spiralis.* También Fonseca-Salamanca *et al.* denuncian, en 2009, que la especie de *Trichinella* más frecuente en el zorro es *T. britovi*, mostrándose en el 100% de los casos estudiados.

En Alemania, en el período 2002-2011, se encontraron larvas en 27 zorros y en Polonia en el año 2010, se detectaron larvas en 44 zorros. Las especies de *Trichinella* halladas fueron *T. spiralis* en 15 zorros de Alemania (una co-infección con *Trichinella britovi* y una con *Trichinella pseudospiralis*) y en 9 zorros de Polonia, *T. britovi* en 8 y 32 zorros de Alemania y Polonia, respectivamente, y *T. pseudospiralis* en 1 zorro de Alemania (Chmurzyńska *et al*., 2013). Como podemos comprobar en estos países, la presencia de

T. spiralis es mayor que la detectada en nuestro estudio, lo cual se debe a que esta especie está más extendida a nivel europeo, pero que poco a poco está ocupando el nicho biológico y desplazando a *T. britovi* en nuestro país, tal y como establecen Fonseca-Salamanca *et al.* (2009) y Pozio *et al.* (2009).

En Rumanía (Imre *et al*., 2015) comprueban que de las 25 muestras de zorro analizadas con éxito, 24 fueron identificadas como *T. britovi* (96%) y las larvas de la otra muestra aislada con éxito fueron identificadas como *T. spiralis* (4%). En Polonia entre los años 2010-2015, se recogieron muestras de zorros rojos para determinar la prevalencia de *Trichinella* spp. Estas larvas fueron identificadas como *T.spiralis* (11,03%) %), T. britovi (71,72%), y *T. pseudospiralis* (0,69%) (Cybulska *et al*., 2016). Por ultimo, en Italia en el periodo comprendido entre los años 2004 y 2010 se detectaros 24 casos positivos de *Trichinella* en zorros, siendo todos los casos *T. britovi.* Como podemos comprobar en todos estos países, la presencia de *T. britovi* es bastante mayor que la de *T. spiralis*, tal y como sucede en nuestro estudio.

Todo esto nos indica que todavía es posible discernir un predominio de *T. britovi* sobre *T. spiralis* en ciclos de vida silvestre en el centro de España, al igual que estableció Blanco-Ciudad, (2012), esto implica la circulación de dichas especies hacia los jabalíes que constituyen la principal fuente de *Trichinella* para los brotes humanos.

Por lo tanto, los presentes resultados nos indican que el zorro rojo debe considerarse como un importante reservorio de *T. britovi* en el ciclo silvestre; mientras que por otro lado, la detección *T. spiralis* en un porcentaje bastante menor sugiere que los zorros han jugado un papel menor en la epidemiología del ciclo doméstico.

8. Conclusiones.

1. Hemos detectado una prevalencia para *Trichinella* del 0,82% en zorros rojos en las provincias estudiadas de Castilla y León, por lo que a raíz de los resultados obtenidos, podemos confirmar, la presencia enzootica de *Trichinella* en carnívoros en el ciclo silvestre, especialmente del zorro rojo.
2. Los machos pueden tener un papel de mayor importancia que las hembras en la diseminación de dicho parásito, lo cual podría ser debido a la necesidad de

los machos jóvenes de abandonar el territorio familiar, lo que produce que se muevan por un territorio más amplio siendo más fácil la posibilidad de predar a mas animales o tener un mayor acceso a carroña, basuras, etc.

3. Los zorros con más edad tiene mayor posibilidad de infectarse con *Trichinella*, posiblemente debido a una mayor depredación y una mayor exposición a la alimentación de carroña y residuos urbanos.
4. La predominancia de cargas parasitarias media-bajas refuerza la necesidad de incrementar la sensibilidad del método de digestión artificial en los estudios epidemiológicos.
5. Este estudio permite determinar áreas potencialmente libres o enzoóticas de *Trichinella* y establecer los principales reservorios, lo que nos va a permitir implantar planes de control de la trichinellosis adecuados a cada situación epidemiológica.

9. Bibliografía

Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., Mccourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F.J.R. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protist. Journal of Eukaryotic Microbiology, 52, 399-451.

Aoun, O., Lacour, S., Levieuge, A., Marié, J., Vallée, I. and Davoust, B. (2012). Screening for *Trichinella britovi* infection in red fox (*Vulpes vulpes*) and wild boar (*Sus scrofa*) in Southeastern France. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(1), pp.223-225.

Arroyo Díaz, J., Jiménez Balbuena, V., Sánchez Ruano, F., Jiménez Luque, V., Coll Moya, L., Bolás Fernández, F., Nogal Ruiz, A., Martínez Fernández, J.J. 2007. Reintroducción de *Trichinella spiralis* desde el medio Silvestre, en una granja industrial porcina. En: Actas X Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 10). Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid., 74.

Badagliacca, P., Di Sabatino, D., Salucci, S., Romeo, G., Cipriani, M., Sulli, N., Dall'Acqua, F., Ruggieri, M., Calistri, P. and Morelli, D. (2016). The role of the wolf in endemic sylvatic *Trichinella britovi* infection in the Abruzzi region of Central Italy. *Veterinary Parasitology*, 231, pp.124-127.

Blanco Ciudad, J. (2012). Epidemiología de la trichinellosis en Extremadura en los últimos 20 años. Trabajo de grado. Universidad de Extremadura.

Blanco Ciudad, J., Gamito-Santos, J., Calero-Bernal, R., Suárez-López, I., Serrano-Aguilera, F. Pérez-Martín, J. (2009). Situación epidemiológica de la trichinellosis en Extremadura (España) en la temporada 2008/2009: peculiaridades detectadas sobre casos de infecciones naturales. Acta Parasitológica Portuguesa, 16, 84–85.

Born, E.W., Clausen, B., Henriksen, S.A. 1982. *Trichinella spiralis* in Walrossen aus dem

Thule-Gebiet, Nordgrönland und mögliche Wede der Übertragung. Zeitschrift für Säugetierkunde. Mammalian Biol., 47, 246-251.

Britov, V., Boev, S. 1972. Taxonomic rank of various strains of T*richinell*a and their circulation in nature. Vestnik Akademii nauk SSSR, 28, 27-32.

Calero, R., Gimeno, A., Hernández, M., López, J., Carpio, F., Dorado, E., Mira, F., Cal, M., Mate, T., Nombela, J., Del Real, G., Navarrete, I., Gómez, L., Habela, M., Reina, D., Serrano, F., Martínez, A., Mantovani, R., y Papadopoulos, G., G. y Scorziello. (1989). Pilot programme to combat trichinellosis. In: Trichinellosis (Tanner, C. E., Martínez-Fernández, A.R., Bolás-Fernández, F. Eds). CSIC Press, Madrid, Spain, 457-463.

Calero, R., Martínez-Gómez, F., Hernández, S., Acosta, I. 1987. Parasitación de Buteo buteo (Aves: Accipitridae) por *Trichinella spiralis* en el parque zoológico de Jerez de la Frontera. Rev. Ibér. Parasitol., 38, 135-138.

Campbell, C. (1983). Epidemiology I: Modes of transmission. In: *Trichinella* and trichinosis (Campbell, W. Eds). Plenum Press, New York, USA, 425–444.

Cavalier-Smith, T. (1998). A revised six-kingdom system of life. Biological Rewiews, 73, 203-266.

Chmurzyńska, E., Różycki, M., Bilska-Zając, E., Nöckler, K., Mayer-Scholl, A., Pozio, E., Cencek, T. and Karamon, J. (2013). *Trichinella nativa* in red foxes (*Vulpes vulpes*) of Germany and Poland: Possible different origins. *Veterinary Parasitology*, 198(1-2), pp.254-257.

Cordero del Campillo, M. 1974. Parasitic zoonoses in Spain. Int. J. Zoonoses., 1, 43-57

Criado-Fornelio, A., Gutierrez-Garcia, L., Rodriguez-Caabeiro, F., Reus-Garcia, E., Roldan-Soriano, M. and Diaz-Sanchez, M. (2000). A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Veterinary Parasitology*, 92(4), pp.245-251.

Cybulska, A., Kornacka, A., Bień, J., Goździk, K., Kalisińska, E., Łanocha-Arendarczyk,

N., Budis, H., Pilarczyk, B., Cabaj, W. and Moskwa, B. (2016). The Occurrence of *Trichinella* spp. in Red Foxes *(Vulpes vulpes*) in Different Regions of Poland: Current Data. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(11), pp.717-721.

De Ley, P. Blaxter, M. 2002. Systematic position and phylogeny. In: The Biology of Nematodes (Lee, D. Eds). Taylor and Francis, London, 1–30.

Dick, T., Pozio, E. (2001). *Trichinella* spp. and trichinellosis. In: Parasitic Diseases of Wild Mammals (Samuel, W., Pybus, M., Kocan, A. Eds). Iowa State University Press, 380–396.

Dupouy-Camet, J. F. Bruschi. (2007). Management and diagnosis of human trichinellosis. In: (Dupouy-Camet, J., Murrell, K. D. Eds.), FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation For Animal Health Press, Paris, France, 37-38.

Fonseca-Salamanca, F., Nogal-Ruiz, J., García-Sánchez, R., Bolas-Fernández, F., Jiménez, S., Alamo, R., Gárate, T., Martínez-Fernández, A. 2009. Prevalence of *Trichinella* spp. in north Spain wild fauna and new variety of *Trichinella britovi* identification. Vet. Parasitol., 159, 22-224.

Forbes, L. B. (2000). The occurrence and ecology of *Trichinella* in marine mammals. Vet. Parasitol., 93, 321–334.

Garkavi, B.L. (1972). The species of *Trichinella* isolated from wild carnivores. Veterinariya, 10, 90-91.

Hughes, W.L., Harley, J.P. 1977. Trichinella spiralis: taxes of first-stage migratory larvae. Experimental Parasitology., 42, 363-373.

Imre, K., Pozio, E., Tonanzi, D., Sala, C., Ilie, M., Imre, M. and Morar, A. (2015). The red fox (*Vulpes vulpes*) plays a minor role in the epidemiology of the domestic cycle of *Trichinella* in Romania. *Veterinary Parasitology*, 212(3-4), pp.448-450.

Kanai, Y., Inoue, T., Mano, T., Nonaka, N., Katakura, K., Oku, Y. (2007). Epizootiological survey of *Trichinella* spp. Infection in carnivores, rodents and

insectivores in Hokkaido, Japan. Japanese Journal of Veterinary Research, 54, 175-182.

Kapel, C. (2000). Host Diversity And Biological Characteristics Of The *Trichinella* Genotypes And Their Effect On Transmission. Vet. Parasitol., 93, 263–278.

Kapel, C. (2001). Sylvatic and domestic *Trichinella* spp. in wild boars; infectivity, muscle larvae distribution, and antibody response. J. Parasitol., 87, 309-314.

Kapel, C., Gamble, H. R. (2000). Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* Spp. in experimentally infected pigs. Int. J. Parasitol., 30, 215–221.

Kapel, C., Webster, P., Gamble, H R. (2005). Muscle distribution of sylvatic and domestic *Trichinella* larvae in production animals and wildlife. Vet. Parasitol., 132, 101-105.

Kapel, C., Webster, P., Lind, P., Pozio, E., Henriksen, S., Murrell, K., Nansen, P. 1998. *Trichinella spiralis, T. britovi*, and *T.nativa*: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection of pigs. Parasitology Research., 84, 264-271

Krivokapich, S. J., Prous, C. L., Gatti, G. M., Confalonieri, V., Molina, V., Matarasso, H., Guarnera, E. (2008). Molecular evidence for a novel encapsulated genotype of *Trichinella* from Patagonia, Argentina. Vet. Parasitol., 156, 234–240.

Kusolsuk, P., Kongkaew, T., Chalamaat, W., Jones, J.L. (2008). Outbreak of trichinellosis caused by *Trichinella papuae*, Thailand, 2006. Emerging infectious diseases, 14, 1913–1915.

La Rosa, G., Marucci, G., Zarlenga, D. S., Casulli, A., Zarnke, R. L., Pozio, E. (2003). Molecular identification of natural hybrids between *Trichinella nativa* and *Trichinella* T6 provides evidence of gene flow and ongoing genetic divergence. Int. J. Parasitol., 33, 209–216.

Learmount, J., Boughtflower, V., Allanson, P., Hartley, K., Gutierrez, A., Stephens, N.,

Marucci, G. and Smith, G. (2015). First report of *Trichinella pseudospiralis* in a red fox in mainland Britain. *Veterinary Parasitology*, 208(3-4), pp.259-262.

Lledó, L., Giménez-Pardo, C., Saz, J. and Serrano, J. (2015). Wild Red Foxes (*Vulpes vulpes*) as Sentinels of Parasitic Diseases in the Province of Soria, Northern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(12), pp.743-749.

Lopes, A., Vila-Viçosa, M., Coutinho, T., Cardoso, L., Gottstein, B., Müller, N. and Cortes, H. (2015). *Trichinella britovi* in a red fox (*Vulpes vulpes*) from Portugal. *Veterinary Parasitology*, 210(3-4), pp.260-263.

López Hernández, B., Gea Velázquez De Castro, MT., Galicia García, MD., Sabonet, C. 2001. Brote epidémico por *Trichinella britovi* en Granada durante la primavera del 2000. Rev. Esp. Salud Pública, 75, 467-474.

López-Olvera, J., Vives, L., Serrano, E., Fernández-Sirera, L., Picart, L., Rossi, L., Marco, I., Bigas, E. and Lavín, S. (2011). Trichinella sp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Catalonia, NE Spain. *Parasitology Research*, 108(6), pp.1589-1591.

Luzón, M., Bohórquez, A., Meana, A. 2009. Datos preliminares sobre la presencia de *Trichinella* spp. en caballos en España. Acta Parasicológica Portuguesa, 6, 108-109.

Marucci, G., La Grange, L. J., La Rosa, G., Pozio, E. (2009). *Trichinella nelsoni* and *Trichinella T8* co-infection in a lion (*Panthera leo*) of The Kruger National Park (South Africa). Vet. Parasitol., 159, 225-228.

Moskwa, B., Goździk, K., Bień, J., Bogdaszewski, M. and Cabaj, W. (2012). Molecular identification of *Trichinella britovi* in martens (*Martes martes*) and badgers (*Meles meles*); new host records in Poland. *Acta Parasitologica*, 57(4).

Mikkonen, T., Oivanen, L., Näreaho, A., Helin, H., Sukura, A. (2001). Predilection muscles and physical condition of raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) experimentally infected with *Trichinella spiralis* and *Trichinella nativa*. Acta Vet. Scand. 42, 441-452.

Nagano, I., Wu, Z., Matsuo, A., Pozio, E., Takahashi, Y. 1999. Identification of

Trichinella isolates by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. Int. J. Parasitol., 29, 1113-1120.

Nelson, M., Wright, T. L., Pierce, A., Krogwold, R. A. (2003). A common source outbreak of trichinosis from consumption of bear meat. J. Environ. Health 65, 16–19.

Nöckler, K., Serrano, F.J., Boireau, P., Kapel, C., Pozio, E. (2005). Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. Vet. Parasitol., 132, 85-90.

Owen, R. (1835). Description of a microscopic entozoon infesting the muscles of the human body. Transactions of the Zoological Society (London), 1, 315-324.

Owen, I. L., Reid, S. A. (2007). Survival of *Trichinella papuae* muscle larvae in a pig carcass maintained under simulated natural conditions in Papua, New Guinea. J. Helminthol., 81, 429–432

Owen, I.L., Sims, L.D., Wigglesworth, M.C., Puana, I. (2000). Trichinellosis in Papua New Guinea. Australian Vet. J., 78, 698–701.

Pérez-Martin, J., Robledo-Berrocal, J., González Ruibal, L., Gamito Santos, J. A., Calero Bernal, R., Pariente Palomino, J., Serrano Aguilera, F. 2007. Evolución de la prevalencia de la trichinellosis en Extremadura: epidemiología de los ciclos doméstico y silvestre. En Actas del X Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 10), Servicio de Publicaciones de la Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 101.

Pérez-Martín, J.E., Serrano, F.J., Reina, D., Mora, J.A., Navarrete, I. (2000). Sylvatic trichinellosis in southwestern. Spain. J. Wild. Dis., 36, 531-534.

Pérez-Martín, J.E., Serrrano, F.J., Reina, D., Navarrete, I. (1992). Distribución de larvas musculares de *Trichinella spiralis* en cerdos ibéricos con baja tasa de parasitación. En: VIII Reunión Anual de la Asociación de Parasicólogos Españoles, León (España)., 50, 27-156.

Pozio, E. (1998). Trichinellosis in the European Union: epidemiology, ecology and economic impact. Parasitol. Today, 14, 35-38.

Pozio, E. (2005). The broad spectrum of *Trichinella* hosts: 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, 3-21.

Pozio, E., Foggin, C.M., Marucci, G., La Rosa, G., Sacchi, L., Corona, S., Rossi, P., Mukaratirwa, S. (2002). *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., Kapel, C. 1999. *Trichinella nativa* in sylvatic wild boars., J. Helminthol., 73, 87-89.

Pozio, E., La Rosa, G. (2000). *Trichinella murrelli* n.sp: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. J.Parasitol., 86, 134-139.

Pozio, E., La Rosa, G. (2003). PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. Methods Mol. Biol., 216, 299–309.

Pozio, E., La Rosa, G., Murrell, K.D., Lichtenfels, J. R. (1992). Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. J. Parasitol., 78, 654–659.

Pozio, E., Marucci, G., Casulli, A., Sacchi, L., Mukaratirwa, S., Fogin, C., La Rosa, G. (2004). *Trichinella papuae* and *Trichinella zimbabwensis* induce infection in experimentaly infected varans, caimans pythons and turtles. Parasitology., 128, 33-342.

Pozio, E., Murrell, K.D. (2006). Systematics and epidemiology of *Trichinella*. Adv. Parasitol., 63, 367–439.

Pozio, E., Paterlini, F., Pedarra, C., Sacchi, L., Bugarini, R., Goffredo, E., Boni, P. (1999). Predilection sites of *Trichinella spiralis* larvae in naturally infected horses.

J. Helminthol., 73, 233-237.

Pozio, E., Rinaldi, L., Marucci, G., Musella, V., Galati, F., Cringoli, G., Boireau, P., La Rosa, G. (2009). Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. Int. J. Parasitol., 39, 71-79

Pozio, E., Varese, P., Morales, M., Croppo, G., Pelliccia, D., Bruschi, F. (1993). Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by Trichinella britovi. The American Journal of Tropical medicine and hygiene., 48, 568-575.

Remonti, L., Balestrieri, A., Domenis, L., Banchi, C., Lo Valvo, T., Robetto, S. and Orusa, R. (2005). Red fox (*Vulpes vulpes*) cannibalistic behaviour and the prevalence of *Trichinella britovi* in NW Italian Alps. *Parasitology Research*, 97(6), pp.431-435.

Rodríguez de las Parras, E., Rodríguez-Ferrer, M., Nieto-Martínez, J., Ubeira, F., Gárate-Ormaechea, T. (2004). Revisión de los brotes de triquinelosis detectados en España durante 1990-2001. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22, 70-76.

Sánchez Acedo, C., Lucientes Curdi, J., Galmes Femeninas, M., Gracias Salinas, M.J. (1989). Prevalence of parasitation by *Trichinella* spp. in diferente animal species from Zaragoza, Spain. In: Trichinellosis (Tanner, C.E., Martínez-Fernández, A.R., Bolás-Fernández, F. Eds.). CSIC Press, Madrid, Spain, 423-425.

Schellenberg, R. S., Tan, B. J., Irvine, J.D., Stockdale, D.R., Gajadhar, A., A Serhir, B., Botha, J., Armstrong, C.A., Woods, S.A., Blondeau, J.M., Mcnab, T. L. (2003). An outbreak of trichinellosis due to consumption of bear meat infected with Trichinella nativa, in 2 northern Saskatchewan communities. J. Infect. Dis., 188, 835–843.

Serhir, B., J. D. Maclean, S. Healey, Forbes, L. (1999). Outbreak of trichinellosis associated with arctic walruses in northern Canada. Can. Commun. Dis. Rep. 27, 31–36.

Serrano, F.J., Pérez-Martín, J.E., Reina, D., Navarrete, I., Kapel, C. (1999). Influence of infection intensity on predilection sites in swine trichinellosis. J. Helminthol., 73, 251-254.

Serrano, F., Bandi, C., La Rosa, G., Pérez-Martin, E., Reina, D., Tasciotti, L., Pozio, E. (1993). Relationship between habitat and *Trichinella* species. In: Trichinellosis (Campbell, C., Pozio, E., Bruschi, F. Eds.). Istituto Superiore di Sanità Press, Rome, Italy, 549–552.

Zamora MJ, Alvarez M, Olmedo J, Blanco MC, Pozio E. (2016). *Trichinella pseudospiralis* in the Iberian peninsula. Vet Parasitol. 2015 Jun 15;210(3-4):255-9.

Zarlenga, D. S., Rosenthal, B., La Rosa, G., Pozio, E., Hoberg, E.P. (2006). An old genus learns new tricks: late tertiary colonization and speciation of *Trichinella* nematodes among eutheria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 7354–7359.

Zarlenga, D.S.; Higgins, J. (2001). PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. Vet. Parasitol., 101(3-4), 215-230.

Zimmermann, W.J., Hubbard, E.D., Mathews, J. (1970). Studies on fecal transmission of *Trichinella spiralis* J. Parasitol., 45, 4441-4445.

Direcciones web:

http://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/vulvul.html

http://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/melmel.html

http://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/marfoi.html

http://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/lutlut.html

10. Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mis padres, a mi hermano, y a toda mi familia el enorme apoyo que he recibido a lo largo de toda la carrera.

En segundo lugar, quería agradecer a mis tutores el trato recibido a lo largo de todo este año, así como a los veterinarios Rafael Calero Bernal, por ayudarme a lo largo del año en el procesado de las muestras y la elaboración del presente trabajo, y Manuel Martín Pérez, por facilitarme todas las muestras utilizadas en el mismo.

Por último, quería agradecer a todos mis compañeros y amigos todos estos años que hemos pasado juntos, pues han hecho mucho más ameno el camino para que en el día de hoy pueda ser un graduado en Veterinaria.