



REAL ACADEMIA DE FARMACIA DE GALICIA

Discurso de Ingreso como
Académico Correspondiente

***TRICHINELLA* SPP.: 40 AÑOS DE TRATO INTERMITENTE**

Excmo. Dr. D. Antonio R. Martínez Fernández

Discurso de presentación por
el Académico de Número Emérito

Ilmo. Dr. D. José María Galleja Suárez



Santiago de Compostela,
8 de octubre de 2025

© Antonio R. Martínez Fernández, Consellería de Sanidade y Real Academia de Farmacia de Galicia.

Maquetación: Miguel A. Suárez.

ISBN: 979-13-990530-2-9.

Depósito legal: PO 448-2025.

Índice

I DISCURSO DE PRESENTACIÓN.....	7
II DISCURSO DE INGRESO	13
Preámbulo	15
Introducción.	19
1 Capítulo 1.	21
1.1 Taxonomía profunda	23
1.2 Encuadre taxonómico particular	24
1.3 Razones para una taxonomía más próxima	26
2 Capítulo 2. Hitos principales de la historia del desarrollo taxonómico de <i>Trichinella</i>.....	33
3 Capítulo 3. Trabajo propio 1. El viaje a América y el parentesco de algunas triquinas	47
4 Capítulo 4. Trabajo propio 2.....	61
4.1 Pequeña historia de nuestra relación con <i>Trichinella</i> spp.....	61
4.2 Aislamientos y biología diferencial.....	64
4.3 Aislamiento reproductivo de parejas simples	71
4.4 Análisis isoenzimático	76
4.5 Infecciones mixtas experimentales.....	85
4.6 Otros enfoques	88
4.6.1 Acercamiento clásico (inicial)	89

4.6.2	Acercamiento cládico (posterior)	90
4.6.3	Los nuevos enfoques. Técnicas genómicas. Amplificación del ADN.....	91
5	Bibliografía citada.....	103

I

DISCURSO DE PRESENTACIÓN

DISCURSO DE PRESENTACIÓN POR
EL ACADÉMICO DE NÚMERO EMÉRITO

Ilmo. Dr. D. José María Calleja Suárez

PARA EL INGRESO DEL ACADÉMICO
CORRESPONDIENTE

Excmo. Dr. D. Antonio Martínez Fernández

Ilmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Farmacia de
Galicia,

Ilmos. Srs. Académicos,

Ilmas. Autoridades,

Señoras y Señores.

En primer lugar, quiero agradecer a la Junta de Gobierno de la Academia que me permita presentar a mi admirado y amigo Antonio Martínez Fernández, que después de más de 40 años vuelve a estas tierras gallegas aportando su experiencia, saber y conocimientos en el campo de las ciencias farmacéuticas.

No es fácil hacer una presentación equilibrada del Prof. Martínez, porque en mi opinión posee uno de los currículos más amplios, densos y completos de un Profesor universitario, para lo que es necesario disponer de mucho más tiempo que el recomendable para este acto.

Antonio Martínez nace en *San Pedro de Luna*, pueblo del Ayuntamiento de *Láncara de Luna* en el norte de la provincia de León, en el macizo montañoso asturleonés, pueblo hoy sumergido bajo las Aguas del pantano de Los Barrios de Luna.

Nace en el seno de una familia numerosa, de padres docentes que le imprimen carácter. Estudia su carrera en la Facultad de Veterinaria de León, licenciándose con Premio Extraordinario y Premio Nacional Fin de Carrera, ingresa en el laboratorio de Parasitología y realiza su Tesis Doctoral bajo la dirección del Prof. Cordero del Campillo, que culmina también con Premio Extraordinario. Y se incorpora a la labor docente en la Facultad de Veterinaria, primero como Ayudante de Clases Prácticas, luego Profesor Adjunto y posteriormente en 1972 alcanza por oposición la plaza de Profesor Agregado de Parasitología animal de la Facultad de Santiago, situación que cambiaría en 1975 al obtener la plaza de Catedrático en esta Universidad, que duraría hasta 1979, cuando por concurso de traslado pasa a ser Catedrático de Parasitología de la Facultad de Farmacia de Madrid.

Estos siete años que transcurre su vida en Galicia, creo que tienen gran trascendencia para él y para la Facultad de Farmacia.

Para él porque conoce una nueva Universidad, nueva Facultad y nuevos contenidos, que creo que le agradan y complementan. Prueba de ello es que posteriormente, ya una vez en Madrid, obtiene el Grado de Farmacia en la Universidad de Alcalá de Henares.

Para la Facultad de Farmacia porque durante todo este periodo se integra y participa en la vida académica de la misma habiendo desempeñado los cargos de Secretario de Facultad, Vicedecano y durante un corto periodo de tiempo el de Decano en funciones.

Y, más importante, la llegada de Antonio Martínez a la Facultad de Farmacia supone realmente el inicio de los estudios de Parasitología animal, asignatura que había sido introducida en los

estudios de Farmacia en el Plan de 1944 y que solo había tenido un catedrático por oposición: Juan Homedes Ranquini que tomó posesión el 12 de enero de 1946 y el 25 de marzo del mismo año fue nombrado Catedrático de la Universidad de Barcelona. Desde entonces esta asignatura había oscilado por diferentes cátedras. Yo cuando cursé esta disciplina de Parasitología animal, lo hice bajo el contenido de Parasitología vegetal.

No solo se normalizó el contenido, sino que se inició la investigación en Parasitología animal y en la Facultad comienzan a defenderse Tesis Doctorales de esta Área, cuyos Doctores pasaron a ser docentes y promotores de nuevos Doctores. Se creó un Departamento y un Área de prestigio con Profesores formados en la misma. Hasta seis Tesis Doctorales dirigidas por él, se defendieron en este periodo. Esto, creo que es el legado más importante que ha dejado el Profesor Antonio Martínez a la Facultad de Farmacia de Santiago, al que por ello debemos enorme gratitud.

En 1979 se traslada a Madrid, también a la Facultad de Farmacia, yo creo que con cierta morriña, y allí sigue poniendo de manifiesto su vocación y el espíritu universitario que ya conocíamos y así, en distintos periodos dirige el departamento de Parasitología animal, también de la Escuela de Análisis clínicos. También ha desempeñado el cargo de Vicerrector de Ordenación Académica y Obras en la Universidad Complutense.

En 1994 ingresa como Académico de número en la Real Academia Nacional de Farmacia donde ha desempeñado cargos como Presidente de Sección, Vicepresidente y Secretario de la Real Academia por un largo periodo.

Toda esta actividad sin descuidar las labores docentes e investigadoras, que se pueden resumir en los siguientes números.

Es autor de más de 200 trabajos de investigación publicados, más de 60 Tesis Doctorales dirigidas, libros y capítulos de libros, toda una densa obra que pone de manifiesto el espíritu de Antonio Martínez.

Y, por último, después de esta extensa carrera universitaria, hay un hecho muy significativo. Antonio Martínez ha querido volver a Galicia, volver a Santiago, donde inició su andadura desligada de su Facultad de Veterinaria, donde llegó con su esposa Nieves y sus hijos José Ramón y Antonio y quiero creer que Galicia, Santiago y la Facultad de Farmacia dejaron mucha huella que ahora quiere recuperar a través de la Real Academia de Farmacia de Galicia, que también tiene que mostrarle gratitud por sus ayudas en nuestro proceso de consolidación nacional.

Gracias por haber vuelto.

II

DISCURSO DE INGRESO

Excmo. Sr. Presidente de la
Real Academia de Farmacia de Galicia,
Excmas. e Ilmas. *personalidades, Sras. y Sres:*

Preámbulo

En esta ocasión para mi memorable, voy a introducir con una mezcla de tres sentimientos: respeto, tristeza y atrevimiento el trabajo normativo de ingreso como Académico correspondiente de esta Real Academia de Farmacia de Galicia.

Respeto por la audiencia de los que bien conozco y los muchos que les han sucedido entre los miembros de esta sociedad de ciencia biológica, aquí bajo el techo protector e iluminante de la farmacia; un profundo respeto nacido hace ya hace 53 años en que el destino me trajo una vez más a estas tierras del Norte y Oeste de este límite subcontinental europeo: el lugar donde históricamente terminaron todas las emigraciones humanas dirigidas siempre hacia el sol poniente y a donde también, con la alegría del que alcanza un objetivo anhelado, llegué un día. El mío era entrar en la Universidad con mayúscula, aunque fuera como maestro.

Tristeza porque dejaba atrás, viniendo a Galicia, el pasado de vivencias como alumno y profesor de un centro proto-universitario, al que sólo la fuerza de las circunstancias me obligó a pertenecer, pero al que había aprendido a vivir, a querer también, donde había cosechado galardones inmerecidos, al que con este paso renunciaba. Lo hacía también al mundillo profesional de la ciudad de León, de la Facultad y del CSIC del que era, en temprana

edad, Investigador Científico. Me alejaba también de aquel valle de mí nacimiento, indestructiblemente feliz en el recuerdo, que reposa ahora bajo el agua del lago artificial de un pantano; constante melancólica que me impregna. Tristeza superada por la ilusión de ser útil en otra universidad, en otra profesión, en estas otras responsabilidades para las que había sido elegido.

Atrevimiento y certeza de que encontraría nuevos retos; los ya intuitivos derivados de dos hechos ciertos: la falta de tradición de la asignatura en esta facultad y la adaptación personal ahora a un programa nuevo: una parasitología para unos nuevos profesionales orientada a la especie humana y muy particularmente a los análisis clínicos; en realidad, no era otra que la llevada a la práctica del programa escrito en la memoria de cátedra de aquella oposición a Agregado de Universidad del pasado diciembre. Pronto supe que la falta de tradición afectaba sólo a farmacia. La fortuna quiso que los vecinos de planta de la vivienda que alquilamos fueran un médico bondadoso Ángel Pensado Couso y el experto naturalista y ayudante del museo de Historia Natural, taxidermista, Santiago Vez Quijano, que además de regalarles pieles primorosamente curtidas a nuestros niños, nos llevó al Museo y allí descubrí la obra memorable del entomólogo Don Luis Iglesias y su texto de Parasitología; museo que durante 33 años había dirigido en la Facultad de Ciencias Químicas y manual de Parasitología, inexplicablemente desconocido por los que a la Parasitología nos dedicamos y que fue el hallazgo más grato de aquel primer encuentro con Santiago y su Universidad; un libro completo, informado, bien escrito, plenamente recomendable y útil a médicos y farmacéuticos. Don Luis ya se había jubilado (1965) y residía fuera de Santiago y su libro se vendía en la Librería González de la Rúa del Villar; sólo quedaban 10 ejemplares a precio modesto. Los compré todos y a los amigos de la profesión he ido regalando.

Hora es, si me permiten, de hacer un mínimo balance. En el Haber del primer año en Santiago, la acogida afable y protectora de los amigos para siempre, José María Calleja Suárez, Gregorio Nicolás Rodrigo, Ramón Álvarez y Marisa su mujer y su casa de Sigueiro, el adusto y cariñoso Don Pablo, (Pablo Sanz Pedrero) Decano entonces, el afable Guitián, tan agudo de mente y tantos otros. Muy especialmente el laboratorio excelentemente dotado del microbiólogo Benito Regueiro Varela, al que todos llamaban Don Benito, porque el Don era en él consustancial. Un científico serio al que deseo rendir homenaje. Su tolerancia y la bondad de Ramonita Bahamonde, el hada buena de la facultad, sostuvieron con paciencia el aterrizaje en la facultad del leonés éste, todo menos diplomático. Acaparador de espacios, de instrumentos y medios; insoportable, supongo.

En el Debe de este recuerdo, la vivienda y su entorno húmedo. Les refiero una anécdota vivida las primeras Navidades en Santiago. Nos fuimos a Madrid y al volver, vimos maravillados que el mantel sobre la mesa redonda de los niños había florecido – retoñado mejor – por flora de hongos recrecidos. La vivienda fue nuestra peor experiencia en aquel Ensanche de Santiago donde convivíamos con 20.000 y pico alumnos universitarios atrevidos.

Algo tenía que tener esta tierra, además del primer invierno en que conocimos la lluvia anti sentido: nos mojaba de abajo a arriba, lluvia integral decíamos; algo permanente en el campo verde, en los ríos llenos de vida, en los hombres disimulando siempre una inteligencia media superior, en la ciudad vieja encantadora y misteriosa y sobre todo, el hecho de pertenecer a una Universidad que respiraba historia, tradición, cultura donde nosotros podíamos añadir algo: crear una cátedra que faltaba y a ello nos dedicamos y aquí, tras mis casi ocho años de estancia, queda afianzada. Científicos como Manuel Luis Sanmartín, Floro Martínez Ubeira,

Elvira Ares Mazas, José M. Leiro y sus descendientes la sirven y bien que se les conoce por su trabajo.

Esta especie de lazo de tiempo, entre el recuerdo de mi venida a Santiago y éste presente en que la Real Academia de Farmacia de Galicia me admite como Correspondiente, produce en mí una imaginaria continuidad placentera que deseo agradecer de inmediato; la invitación de esta academia me ha vuelto a aquellos años de mi experiencia compostelana en la que entré de pantalón corto y salí adulto y que ahora tengo la ocasión brindada de reconocer.

Como tantas cosas buenas – el nombramiento de Correspondiente de esta Academia- ni me atreví a desearlo, surgió en este caso de la magnanimidad de vuestra dirección y de lo saludable del recuerdo de tantos compañeros y amigos que aquí han hecho su carrera y han sido recompensados con el honor de crear y sostener esta academia de las ciencias farmacéuticas: Jose María Calleja, Jesus Simal, Jesús Izco, Francisco Díaz-Fierros, José Miñones, Isaac Arias, Enrique Raviña, Franco Fernández, Isabel Cadavid: con todos conviví como docente aquí y a todos y cada uno les debo algo, gracias. Y especialmente a vuestro actual Presidente Ángel Concheiro Nino y a su Junta directiva, gracias por invitarme a formar parte de esta entidad. Gracias especialmente porque ello significa, repito, una especie de lazo permanente entre mi pasado casi juvenil por estas tierras y el presente de este final de ciclo en que me encuentro.

El discurso:

***Trichinella*, protagonista de esta revisión**

Introducción.

Consta de cuatro capítulos, dos de naturaleza introductoria y dos, resumen de publicaciones propias sobre aspectos de la biología de las especies de *Trichinella*.

Los dos iniciales, son un intento didáctico, desde mi óptica, de seguir el avance del conocimiento de la vida y evolución de un nematodo parásito que, sucesivamente, pasó de ser mera curiosidad científica a identificarse como peligroso enemigo de la salud humana. Controlado de modo eficaz este último aspecto, la triquinosis, anécdota de su biología, -sólo al hombre atribuible ya que es una de las consecuencias de la domesticación y explotación masiva de cerdos, que, por otra parte, sirvió para crear y afianzar una de las misiones sociales de la profesión veterinaria, la inspección y seguridad de los productos cárnicos- ; parecía de nuevo que todo estaba hecho en *Trichinella*. Y una vez mas no fue así, gracias a su elaborada biología que utiliza un mismo individuo como si dos hospedadores se trataran, y a la facilidad de su manejo, se convirtió en un socorrido modelo experimental, sólo posteriormente superado por *Caenorhabditis elegans*, en el mundo amplísimo de la experimentación con nematodos.

En el capítulo primero de este discurso intentamos mostrar quién es *Trichinella* y sus especies y qué lugar ocupa en la naturaleza: su origen, filogenia y taxonomía conocida por el momento.

El segundo capítulo de esta a modo de introducción, desgana los pasos del progreso de conocimiento del nematodo a través de una asociación científica específica, ICT (*International Commission on Trichinellosis*), creada en la década de los sesenta del pasado siglo XX, extendiéndose hasta los años veinte de este XXI en que termina, en mi caso, el tiempo activo como parasitólogo; son 48 años del avance en el conocimiento de estos nematodos parásitos singulares.

Tras esta prolija introducción, dos capítulos más mostrando el trabajo personal mío y de los alumnos de doctorado de las facultades de farmacia de las universidades de Santiago de Compostela y Complutense de Madrid. El capítulo tercero está dedicado al “viaje a América de *Trichinella*” desde España, desde los años inmediatamente siguientes al descubrimiento a la formación en Norteamérica de la raza porcina Duroc, así como la importación de jabalies europeos y con ellos también, una vez mas, el viaje como polizón de *Trichinella*.

Finalmente, el capítulo cuarto, es un recopilado breve de algunos trabajos propios, fruto de tesis y publicaciones al efecto.

1 Capítulo 1.

Trichinella (neologismo del griego *thris*, *trichos*<cabello> e *inis*<niño>) es el diminutivo del nombre originario *Trichina*, asignado por Richard Owen para un nuevo género de nematodos que en el tiempo presente cuenta con especies que parasitan a reptiles, aves y mamíferos.

Cuando en 1835 Richard Owen se apropió del descubrimiento del estudiante de primer curso de medicina James Paget, publicó el descubrimiento de aquel entozoo parásito con el nombre *Trichina spiralis*. Así se difundió aquel hallazgo extraordinario como una curiosidad. Pero 60 años más tarde, cuando ya se reconocía que era un importante parásito patógeno, el profesor veterinario de Historia Natural de la Escuela Nacional Veterinaria de Alfort (París) Louis Joseph Alcide Railliet, comprobando que el nominativo *Trichina* estaba ya ocupado, en aplicación de la Ley de Prioridad del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, cambió su nombre al diminutivo *Trichinella* con lo que la especie de nematodo que parasitaba a aquel fabricante de barómetros italiano Paolo Blanchi, cuyo cadáver disecaba el estudiante James Paget, su descubridor real, pasó a llamarse *Trichinella spiralis* (Owen 1835, Railliet 1895). No fue tarde bajo el punto de vista de nomenclatura zoológica, sí para el lenguaje habitual que siguió denominándola *Trichina* o su transliteración Triquina y a la enfermedad que causa, Triquinosis. *Trichinella spiralis* fue sólo la primera de las 11 especies gemelas y tres genotipos que hoy se reconocen en la taxonomía aceptada el

género, a su vez, imagen supuesta del proceso evolutivo de esta especiación particular.

No es aquí el lugar para desarrollar la historia del proceso, véase al respecto obras como Gould(1), Grove(2), Pozio y Murrell(3), ni su morfología, ecología, infección natural, patogenia, diagnóstico, tratamiento, profilaxis, control (Cordero, M. et al.)(4). Tan sólo nos vamos a ocupar de este género de invertebrados, parásitos obligados, discurriendo a través del escalado universal de su conocimiento y particular en mi –nuestro – progreso en manejarle y entenderle mientras lo utilizábamos como modelo de enseñanza y parasitología experimental.

Trichinella es un género perteneciente a un grupo evolutivo de animales invertebrados (los nematodos, *Nematoda*) que son uno de los más abundantes en la tierra, tanto en número de especies como de individuos de una especie determinada. Las cifras que adelantan los textos y autores son muy variadas, Chapman(4) en una estimación media apunta entre 12.000 bien descritas y más de 80.000 las de algún modo denunciadas entre las más de 500.000 posibles. Si se considera el hecho de que, en la práctica, cada especie de planta y animal terrestre tiene al menos una especie de nematodo parásita, si sólo se considera el parasitismo en plantas y en vertebrados, por encima de 25.000 deben ser las especies de nematodos con este hábito. Realmente, se conoce someramente el Phylum y pudiera haber millones de especies esperado ser identificadas y nombradas.

Continúa siendo controvertido su lugar en la naturaleza, oscilando, en el progreso de los taxónomos entre la consideración de Clase dentro de un Phylum o Phylum propiamente dicho Nematoda. Incluso el nombre y su acentuación llana o esdrújula es polémico. Por el momento, abandonándose la inclusión clásica entre los Articulata (anélidos más artrópodos), se acepta de

momento el supuesto origen común de nematodos y artrópodos propuesto, tras el análisis de marcadores moleculares por Aguinaldo y col 1997(5), (6), formando el Superphylum Ecdysozoa (etimológicamente, los que mudan) que agrupa a nematodos y artrópodos; mudan para crecer a lo largo de su ciclo vital desde el primer estado que emerge del huevo al adulto, al estar encerrados por un exoesqueleto. El inconveniente, entre otros, es la naturaleza y función de éste en los artrópodos como cajas articuladas rígidas de quitina y en los nematodos como cubierta externa modelable de colágeno. También se acepta la ausencia común de un estado larvario inicial ciliado, que sí tienen los otros invertebrados prostómicos, por lo que las fases previas al estado adulto no son larvas como así llamábamos los parasitólogos, sino juveniles; los cinco estados juveniles : J1, J2, J3, J4 y J5 separados por cuatro mudas, del ciclo biológico enunciado por Émile Maupas 1899(7), el descubridor de uno de los modelos universales, *Caenorhabditis elegans* que, junto con *Drosophila melanogaster*, un nematodo y un artrópodo, son los dos grandes modelos de investigación biológica; los primeros metazoos también a los que se secuenció el genoma entero en sus primeros borradores.

1.1 Taxonomía profunda

En una moderna clasificación de los nematodos como la aportada por Dorris et al.(8) se supera, con las bases morfológicas y ecológicas clásicas, la idea filogenética de la doble composición del filo en dos clases monofiléticas: **Adenoforea** (portadores de glándulas) y **Secernentea**; considerando que es más posible que los Adenoforea sean parafiléticos, y origen de los Secernentea.

Los abundantísimos adenoforea habitan en el mar, aguas dulces y suelos, con unos pocos parásitos de animales y plantas, mientras que los Secernentea son fundamentalmente terrestres, con

muchos grupos enteramente parásitos. Esta línea argumental se afianza mediante los métodos filogenéticos moleculares. Así, el análisis de la subunidad pequeña del ARN ribosómico sugiere que los nematodos surgen de adenofores ancestrales y a partir de uno de sus órdenes principales, los Chromadorida, se organizan los Secernentea. Se identifican así cinco **clados**, dos estrictamente adenofores: **Clado I y II**. Aunque en ambos hay algún grupo que parasita vegetales, en el **Clado I** predominan los parásitos animales tanto de vertebrados (como *Trichinella*, objeto de este documento) como de invertebrados.¹

1.2 Encuadre taxonómico particular

Asumiendo que los nematodos son el filo de invertebrados posiblemente menos explorado, con un número millonario de especies vivas, de las que cada año se describen centenares y se agrupan en filogenias moleculares particulares, resulta tarea ardua proponer una clasificación actualizada que se apoye en las tres bases ahora clásicas: morfología, molecularidad y biología-ciclo o desarrollo -. Hodda 2022(10) la aborda una vez más. Simplificando, esta es la situación particular que nos interesa:

Phylum Nematoda

Clase Dorylaimea,

Orden Trichocephalida,

Familia Capillaridae con 20 géneros;

¹ El resto de los clados se fue acomodando en ensayos de clasificación posteriores (Blaxter & Koutsovoulos(9) 2012. Así, en el **Clado III** se sitúan los grupos parásitos de interés sanitario: ascáridos, oxiúridos, espirúridos); en el **Clado IV** los otros grandes patógenos vegetales (tilénquidos) además de Strongyloides de animales; finalmente en el **Clado V** se sitúan los strongílidos parásitos y rhabdítidos de vida libre (*C.elegans*, por ejemplo).

Familia Cystoosidae, con 2 géneros

Familia Trichinellidae con cuatro géneros

Brevitomis, con 1 especie

Echinocoleus, 5 especies

Hepatospira, 1 especie

Trichinella, 10 especies y tres genotipos

Familia Trichosomoididae, con 5 géneros

Familia Trichuridae, con 6 géneros

En el trabajo de Hodda citado, se recoge también la propuesta de Andrey S. Bessonov 1996, en que divide el género *Trichinella* en dos subgéneros: *Trichinella* (*Trichinella*) y *Trichinella* (*Bessonoviella*). *Bessonoviella* (Bessonov 1996) es un sinónimo de *Trichinella* (Railliet, 1895) IRMNG (Interim Register of Marine and Nonmarine Genera) <https://www.irmng.org/aphia.php?p=taxdetails>.

Superada esta anécdota taxonómica, para mí, y supongo para muchos de los lectores de este texto, la sorpresa es la aceptada inclusión de cuatro géneros en la Familia Trichinellidae. *Trichinella* fue durante 137 años, desde 1835 hasta 1972, el raro ejemplo de una Familia de animales con un solo género, y a su vez, con una sola especie: *Trichinella spiralis* (Owen 1835) (Railliet, 1895) y con un ciclo biológico único bautizado con un término aparentemente contradictorio: autoheteroxeno (*auto*- uno mismo, *heteros* - otro, - *Xenos* hospedador), otra curiosidad. En el momento actual se le añaden varios compañeros: *Echinocoleus*, *Brevitomis*, *Hepatospira*; con independencia de este último género, con una sola especie. La clave de identificación, adaptada de la publicada por J.J.Vicente et al.(11) es la siguiente:

Identificación de géneros de la Familia Trichinellidae:

- Bolsa copuladora del macho formada por dos lóbulos, no asociados entre sí por una membrana, con vaina espicular espinosa:
 - Con espícula: *Echinocoleus*, López -Neyra, 1947
 - Sin espícula: *Brevitomix*, Travassos et al. 1964
- Bolsa copuladora formada por dos lóbulos, no asociados entre sí por una membrana:
 - Sin vaina ni espícula. *Trichinella*, Railliet, 1895

La especie *Brevithominx asperodorsus* que fue descrita por Travassos y col. en la revista Bolm. Biol. Prof. Mello-Leitao, vol. 23. p. 14, parasitando la submucosa de la molleja de aves linnícolas de Suramérica. La volvió a encontrar Fagundes Avancini, 2009 (12) en el pájaro quero, quero *Venellus chilensis* (Molina, 1782). También cuenta con una sola especie conocida Hepatoespina, *H. acerinae* que fue descrita por Thieme, 1961 (13) parasitando el hígado de la perca *Acerina cernua*. Son más numerosas las especies descritas del género *Echinocaulus*, López-Neyra, 1947 (14) creado al describir en los rabilargos (*Cyanopica cyanus*) de la Península Ibérica como *E. cyanopicea* n.g.n., n.sp., especie tipo. A este género se asignan hoy dos especies parásitas de aves y dos de peces.

1.3 Razones para una taxonomía más próxima

El género *Trichinella* es el más abundante en especies identificadas. De ser durante los mencionados 132 años una especie única, a contar hoy con 13 taxones: 10 especies admitidas y tres variedades innominadas salvo por las siglas T8 (Sudáfrica), T9 (Japón) y T6 Montañas Rocosas al Oeste y Apalaches al Este de Norteamérica. Además, tenemos la certeza de que no está aún finalizado el conocimiento de la radiación adaptativa del género;

fenómeno oculto, con especies crípticas, tras la “comodidad evolutiva” de un ciclo autoheteroxeno, en el que el mismo hospedador es el definitivo - en el que se alcanza el estado adulto y la reproducción sexual- y, el intermediario, donde el estado juvenil J1 (convencionalmente, Larva I) espera la llegada del nuevo hospedador que es otro carnívoro u omnívoro, ya sea depredador o simplemente carroñero.

El ciclo autoheteroxeno suministra una enorme estabilidad; enlentecimiento del proceso evolutivo. La evolución no obstante continúa a través, por una parte, del hospedador (según su susceptibilidad o resistencia y hábitos alimentarios) en el área geográfica adoptada – emigración obligada por cambio climático - (alopatrismos sobrevenidos)-. Por otra parte, de la resistencia de los juveniles del parásito a la pérdida de riego sanguíneo y muerte del sincitio muscular que les alberga y sometimiento a las condiciones térmicas del medio ambiente (resistencia a la putrefacción; resistencia a la congelación). Todo el proceso de la especiación oculta de *Trichinella* sucede hace poco tiempo: en el Mioceno y Plioceno del Neogeno, entre el Paleogeno y el Cuaternario (Pleistoceno y Holoceno). El aparente motor principal de la evolución oculta del género fueron las glaciaciones en el hemisferio norte terrestre.

El trabajo de Korhonen et al. 2016(15) es el último intento conocido de reconstruir la filogenia del género tras secuenciar y ensamblar el borrador de 16 genomas enteros de 9 especies: *T. spiralis*, T1; *T. nativa*, T2; *T. britovi*, T3; *T. murrelli*, T5; *T. nelsoni*, T7; *T. patagoniensis*, T12) y tres genotipos (T8, T9 y T6), definiendo las identidades genéticas de los taxones por las diferencias entre los grupos de genes codificantes de proteínas. Asimismo, comparando miles de secuencias de genes ortólogos de copia única, presentan una hipótesis sólida de la filogenia del género. Estiman que, coincidiendo con la transición entre el Oligoceno y el Mioceno, al

comienzo de éste, hace unos 21 millones de años, se produjo a partir del ancestro común paleogénico, la separación entre las triquinas **acapsuladas** – quistes musculares rodeados de una lámina de colágeno visible solo por microscopía electrónica –, de reptiles y aves y secundariamente de mamíferos, de las **capsuladas** – quistes musculares rodeados de una espesa capa de colágeno, visible por microscopía óptica convencional –, sólo en mamíferos. Ya, previamente Zarlenga et al. 2006(16) habían llegado, por métodos diferentes a parecida conclusión.

Con referencia sólo a las capsuladas, la posterior radiación adaptativa producida hace entre 10 y 7 millones de años, justo al final del Mioceno, supuso la separación entre las nada resistentes a la congelación (*T. spiralis* y *T. nelsoni*) y todas las otras especies resistentes en distinto grado. A lo largo del Pleistoceno van a suceder las separaciones posteriores de estas últimas. Su motor evolutivo, deducimos, se debió al doble efecto de las sucesivas glaciaciones sobre ambos (*Trichinella* y mamífero); bien ocasionando avances en la resistencia a la congelación de la *Trichinella* o bien provocando la emigración del hospedador hacia áreas más templadas, sin excluir el efecto simultáneo de ambos procesos. Cada caso o su suma se tradujeron en las sucesivas y consecuentes especiaciones alopátricas – aislamientos duraderos en áreas geográficas separadas–, formadoras de especie.

Las estimaciones deducidas vienen a postular que la radiación de las *Trichinella* encapsulada (exclusivas de mamíferos) comienza con la mencionada separación entre *T. spiralis* y *T. nelsoni* (7,8-4,1 millones de años) y las siguientes durante unos 3 millones de años, en el Plioceno temprano, *T. patagonensis*, en el Plioceno medio, *T. nativa* y en el final, por una parte *T. murrelli* en Norteamérica y *T. britovi* y T8 (3,2-1,7 millones de años) en los extremos suroccidentales de Europa y el norte y noroeste de África.

Korhonen et al 2016(14) sugiere también que la formación de *T. pseudospiralis* coincide con el levantamiento de la meseta tibetana y el cambio climático alrededor de 10-8 millones de años del último tercio del Mioceno. Posteriormente, la divergencia entre *T. papuae* y *T. zimbabwensis* (4,9-2,3 millones de años), posiblemente fue contemporánea con el cambio climático y extinciones del Plio-Pleistoceno.

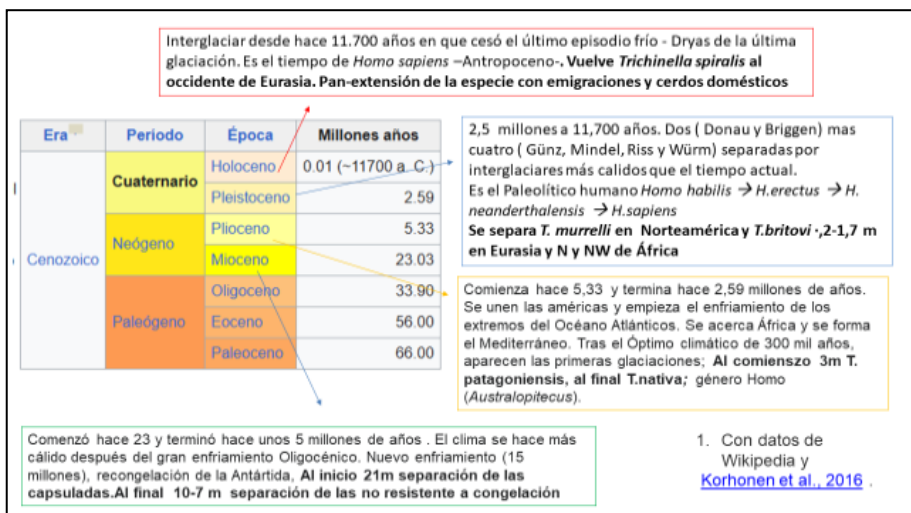


Figura 1. Hipótesis de tiempos geológicos de especiación de *Trichinella* spp.

Parece que los cambios climáticos – glaciaciones – y la reorganización consecuente de los ecosistemas, con emigraciones de huida y recolonizaciones posteriores, con aislamientos geográficos, labraron la especiación oculta de *Trichinella*.

Como estos pulsos taxonómicos se ven amortiguados por un ciclo biológico tan elaborado y seguro – apoyada en la depredación y carroñerismo, la esencia vital de sus hospedadores carnívoros y omnívoros – y se produce en un tiempo geológico de reciente a muy reciente, la especiación es *críptica* – inaparente –, exclusivamente genómica tanto entre las capsuladas como entre las acapsuladas.

Por otra parte, todo este fenómeno es originario del hemisferio norte - Eurasia más África y América del Norte, extendiéndose de modo secundario, con aves o emigraciones a áreas biogeográficas del Sur (áreas australiana y neotropical – Sudamérica –).

Desde el Pleistoceno y especialmente en el Holoceno, un nuevo motor ecológico, la estirpe del hombre, ha contribuido, con sus emigraciones y la domesticación del cerdo y el caballo, a transformar el ámbito ecológico de las especies formadas, especialmente con la primera descubierta: *T. spiralis*, llevada así a un área universal desde dos extremos occidentales de Eurasia: la Península ibérica primero y las Islas Británicas más tarde.

Parece razonablemente satisfactoria la reconstrucción filogénica de estos últimos aproximadamente 20 millones de años, pero nada de momento conocemos del origen y vicisitudes del ciclo que suponemos fue reconstruido a lo largo del Paleogeno (casi 30 millones de años de las eras Paleoceno, Eoceno y Oligoceno) inmediatamente posteriores a la última gran extinción del límite Cretáceo/Paleoceno (K-Pg en la terminología actual), hace 66 millones de años. Ni de los millones de años previos, lo que se intenta reconstruir por indicios.

Así es. No contábamos con otros datos más que con algún aspecto de biología parasitaria comparada al observar la presencia en *Trichinella* de caracteres objetivamente plesiomórficos (antiguos, primarios) como es la presencia en juveniles de un dardo bucal perforador (en el embrión de todas las especies y el juvenil de primer estado (J1 o L1) muscular de las especies acapsuladas y algunas de las capsuladas) ,y la capacidad de cambio ecológico de este **J1**, es decir, de ser infectante para el siguiente hospedador en el ciclo biológico. Hecho éste que les separa de los demás nematodos en los que es el **J3** el que juega este papel. También podría ser plesiomórfica la capacidad de inducir en el hospedador la

formación de sincitios nutricios consecuentes al parasitismo endocelular. Esta característica es propia de todos los grupos que parasitan animales del **Clado I** Dorylaimidos, al que pertenece *Trichinella*, que se vienen a comportar, a pesar de su tamaño, como parásitos endo- celulares.

Otro caracter plesiomórfico se incorporó recientemente en este desmentir el "mentir de las estrellas"(17): la presencia en todos los Dorylaimidos de la enzima zianasa, homóloga a la que es propia de vegetales y que explica el tiempo de inicio del parasitismo y su permanencia,(Zarlenga et al. 2017(16) y 2024(19)). Como consecuencia de la publicación por Mitreva et al 2011(20) del borrador del genoma completo de *T. spiralis*, se observan 15 dominios proteicos diferentes a los de los demás nematodos, entre los cuales, 13 son patrimonio de bacterias, plantas y hongos , por lo que su presencia y persistencia en *T. spiralis* sólo se puede explicar por transferencias génicas horizontales útiles. Una de estas proteínas es la cianato-liasas antes conocida como cianasa, que interviene en el paso de cianato a amonio y CO₂ y que juega un papel vital en la vida intracelular de *Trichinella*. Permite la instalación y pervivencia de *Trichinella* en la célula muscular y explica también la falta de selectividad del parasitismo entre tan amplio número de especies hospedadoras. La adquisición fue anterior a la separación entre Dioctophymatida y Trichinelloidea ya que permanece en ambos. Se propone que los ancestros de *Trichinella* adquirieron este gen durante el periodo Devónico (hace 350 a 400 millones de años).

La cianasa, que es característica de bacterias, plantas y hongos, se encuentra en todos los nematodos parásitos, y por ello, adquirida probablemente por previas transferencias génicas horizontales, y está ausente en los nematodos de vida libre. Ocurre que, en el **Clado I** (Dorylaimida: Orden Trichocephalida: *Trichinella*

spp.) es como la de los vegetales, mientras que en los otros clados de nematodos parásitos, es homóloga a la de las bacterias.

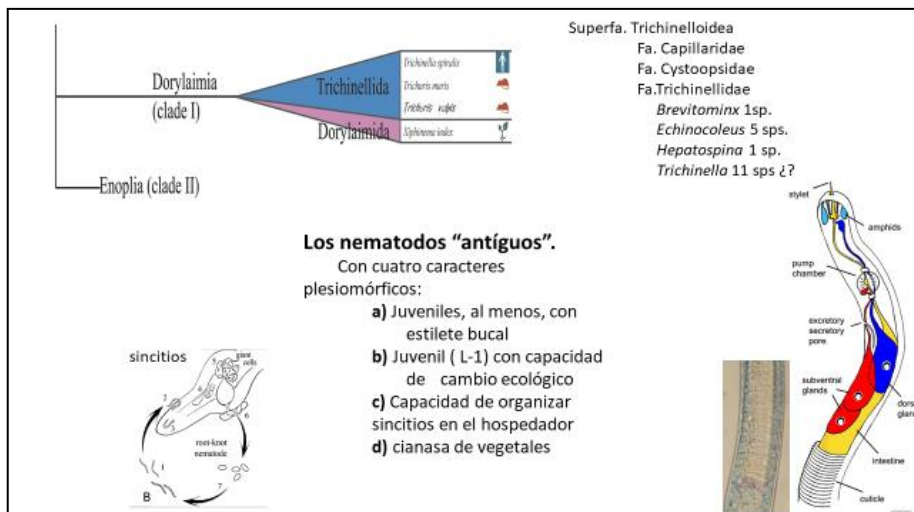


Figura 2. Encuadre taxonómico y caracteres plesiomórficos de *Trichinella* spp.

En un avance hipotético de mayor amplitud, Zarlenga et al. 2024(19) comparan tres sucesos evolutivos de *Trichinella* con el devenir geológico histórico durante los 500 millones de años de la relación entre la temperatura global y los sucesos de extinción masiva de las especies. Señalan que la transferencia horizontal de enzimas como cianasa sucedió en el antecesor común del Orden después de la gran extinción Ordovocico/Silúrica (alrededor de hace 420 ma); la diversificación entre *Trichinella* y *Trichuris* alrededor de la extinción de de hace 250 ma (Pérmico/ Triásica); y la separación entre acapsuladas y capsuladas, después de la extinción K/Pg Cretaceo/Paleogeno, de hace 65 ma.

Se completa así, por el momento, la posible radiación adaptativa de *Trichinella*.

2 Capítulo 2.

Hitos principales de la historia del desarrollo taxonómico de *Trichinella*

Al iniciarse este 2025 en que trato de revisar la historia del reconocimiento de la especiación de *Trichinella*, se admite de modo unánime que en el género hay dos grupos de especies reconocidas por la presencia o ausencia de una gruesa capa de colágeno alrededor del quiste muscular que alberga el juvenil (J1 o L1, como se prefiera) infectante para el siguiente hospedador. Por una parte las triquinas encapsuladas, un clado con, por el momento, siete especies que infectan a mamíferos: *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. murrelli*, *T. nelsoni*, *T. patagoniensis* y *T. chanchalensis*. Por otra, las acapsuladas, con tres especies: *T. pseudospiralis* capaz de infectar a mamíferos y aves, *T. papuae* y *T. zimbabwensis* que parasitan a algunos reptiles y a mamíferos.

Antes de desgranar los pasos que entre 1972 y 2020 en que se esclarece este panorama zoológico de especies de *Trichinella*, es necesario rendir homenaje a dos iniciativas que han servido de acicate del mismo. Por una parte, la Comisión Internacional sobre Trichinellosis ICT (“*International Commission on Trichinellosis*”) entidad itinerante entre Europa y América en origen, y sus reuniones periódicas a modo de congresos llamadas ITC (“*International Trichinella Conferences*”) repetidas 16 veces desde 1960 a 2023; véase para su historia inicial el artículo de Dupouy-Camet (21). Por otra, la constitución en el “Istituto Superiore di Sanità” (ISS), Roma, Italia en 1988 del ITRC (“*International Trichinella Reference Centre*”)

como laboratorio de referencia del ICT que posteriormente fue reconocido por la OIE (“*World Organization for Animal Health*”), y que se solapa ahora, en la UE, con los laboratorios de referencia nacionales de parasitología (EURLP), cooperando en el estudio y control de la triquinosis (22).

Varios textos como los de Gould (1), Grove(3), Campbell(23) o de nuestro grupo (24) (25) resumen muy bien los primeros pasos de la historia y el conocimiento de este nematodo parásito.

Trichina spiralis (Owen,1835) dejó de ser una curiosidad científica cuando, bajo el punto de vista zoológico se demostró la capacidad infecciosa de los quistes musculares y su transformación en adultos macho y hembra en el intestino del siguiente hospedador, (R.Virchow) (26) y , bajo el punto de vista médico, cuando se demostró causante de una enfermedad humana mortal (27) (28). Se había cerrado un capítulo nuevo de la patología parasitaria, identificada la epidemiología y las medidas de control.

Parecía que todo estaba ya conocido y se cayó en ese estado de suficiencia científica fruto de algún conocimiento evidente y una mayor ignorancia. Afortunadamente *Trichinella* – maestra de parasitólogos – es también un magnífico modelo experimental, lo que hizo que, cuando paulatinamente la parasitología dejó de ser mera zoología, empezase a dar frutos en campos tan diversos como la terapia antihelmíntica, métodos de diagnóstico, profilaxis, epidemiología, biogeografía, especiación; *Trichinella* pasó a ser un socorrido modelo de parasitología experimental.

Del progreso en el tiempo del entendimiento de la especiación del género, sigue esta revisión.

Este progreso cristaliza en reuniones científicas, anuales y publicaciones que asocian los diversos aspectos médicos y parasitológicos de las triquinas y triquinosis en sentido amplio. Las

primeras reuniones monográficas sobre el tema tuvieron lugar en Chicago (Illinois, Estados Unidos) en 1953 y 1954 (29) y (30). Cuatro años más tarde, por iniciativa del Profesor Zbigniew Kozar y la Sociedad Polaca de Parasitología, se funda la Comision Internacional de Trichinellosis (ICT) que en 1960 organiza en Varsovia la Primera conferencia Internacional sobre Trichinellosis (ITC I) (21)

Había pasado un siglo desde el descubrimiento y denominación de este nematodo parásito y los parasitólogos empiezan a superar su visión corta de medicina humana o animal, dirigiendo su mirada hacia la naturaleza. *Trichinella*, además del ciclo epidemiológico rata/ cerdo y cerdo/cerdo/hombre, circula también espontáneamente en la naturaleza entre mamíferos salvajes depredadores y carroñeros. Lo describieron los que exploraron su presencia entre los carnívoros de tierras alrededor del Océano Ártico: el veterinario norteamericano Robert L Rausch (31) y el biólogo danés H. Madsen (32), que encontraron *Trichinella* – todo era *T. spiralis* en este tiempo – como parásito habitual entre la fauna de carnívoros locales, así como su resistencia a la congelación y la patogenicidad para el hombre en aquellas tierras boreales.

En el extremo geográfico opuesto, el sub-trópico africano, unos cuatro años más tarde, superada ya las luchas por la independencia de Kenia, surge la infección masiva de unos jóvenes que cazan furtivamente y consumen directamente un suíno salvaje *Potamochoerus porcus*; *Trichinella* está también en África subtropical (33) y (34). En ambos casos, tanto en el extremo norte como en el sub-trópico, con ausencia de cerdos domésticos y ratas grises. Había, especialmente en la “cepa” de Kenia, con la que se ensaya en condiciones experimentales, una notoria diferencia biológica con respecto a una cepa londinense de *Trichinella* (la futura ISS25): escasa infectividad para el cerdo doméstico y rata, con calcificación

muy rápida de los quistes musculares(35). Estos hechos fisiológicos van a contribuir a una confusión inicial: las triquinellas que masivamente parasitaban a aquellos muchachos - 2000 larvas/g de media de infección, aunque sólo uno murió -, para las condiciones experimentales de aquel tiempo, eran muy difíciles de mantener. Al parecer no se pudo conservar aquella cepa, que, por primera vez en la historia, se había encontrado al SE del Sahara.

Se estaba llegando a una conclusión palmaria: tanto en el extremo Norte de Norteamérica como en el Este africano había en la naturaleza otras triquinellas diferentes a la conocida *T. spiralis* que tan eficazmente parasitaba al cerdo doméstico y consecuentemente al hombre.

La Guerra Fría dificultaba en parte el intercambio de información, pero en toda la Unión Soviética y repúblicas satélites, investigadores muy profesionales, como el Prof. S.N. Boev en Alma Ata (Kazajistán), V.A. Britov desde Vladivostok e I.V. Orlov desde Moscú, llamaban la atención desde la revista parasitológica polaca (Wiad. Parazyt.)(36), de la presencia en aquel medio mundo, como hecho bien conocido ya por los trabajos de campo, de cepas diferenciadas de *Trichinella*, adaptadas a las diferentes condiciones climáticas de desierto, taiga y tundra euroasiáticas (Pereverzeva 1966)(37)

Quizá el traslado del Dr. Nelson, tras siete años en el Servicio Médico de Uganda y Kenia, a la London School of Hygiene and Tropical Medicine, retrasó un tiempo proseguir en el mayor conocimiento de la cepa de triquinella causante del primer brote humano de Kenia. Pero sí despertó el interés de la búsqueda en el campo, en otros países africanos, de animales salvajes infectados de triquinella. Uno de los lugares de naturaleza prístina elegidos fue el Parque Kruger, en Sudáfrica, en la frontera con Mozambique. Allí se encontró parasitando a una hiena moteada *Crocuta crocuta*, una

nueva cepa africana que llegó a Londres y de allí a Wroclaw en Polonia; para el concepto epidemiológico general del momento sobre *Trichinella* se asumió que era otra muestra, en este caso más manejable, de *T. spiralis* en el Este de África; mas, como más tarde se logró entender, lo hallado de nuevo, no era del mismo clado al que pertenecía la que infectó masivamente a los jóvenes en Kenia. El nuevo aislamiento africano se halló a unos 2.500 Kms, hacia el SE del continente y sin duda difería del original del brote inicial en Kenia: en este caso, sí infectaba aceptablemente bien a los animales de laboratorio y se podía mantener por pases sucesivos.

Los esposos Koza en Wroclaw (la antigua Breslau, ahora Polonia) en 1965 (38), compararon el aislado procedente de la hiena del Parque Kruger, enviado por el Dr. Nelson, con el aislado de cerdos domésticos de Polonia (*T. spiralis*) probando que eran dos entidades biológicas diferentes.

En 1968 el Prof. Zbigniew Kozar organizó en la Universidad de Wroclaw, la Segunda Conferencia Internacional sobre Trichinelosis ICT-2 donde presentamos los primeros datos españoles de *Trichinella* en la fauna salvaje de la Península – Cordero, M. et al. 1970(39) –, así como, entre otros, el trabajo del Dr.S.P. Kruger de Johannesburgo sobre las características biológicas experimentales de la cepa Sudafricana de *Trichinella* (40), la aislada de *C. crocuta* en el Parque Kruger

Había llegado el tiempo de expresar en términos taxonómicos lo observado en la naturaleza y así empezaron a hacerlo los laboratorios de parasitología, gracias a tres hechos previamente comprobados:

- 1) Que los J1 (L1) infectantes contaban con un discreto dimorfismo sexual, observado en principio por Villella 1966 (41) ;

- 2) Que bastaban dos larvas, macho y hembra, para ocasionar en ratón una infección muscular apreciable, y
- 3) Lo comúnmente aceptado: los individuos que se reproducen entre sí y producen descendencia fértil son de la misma especie, y lo contrario.

Siguiendo este proceso, Britov y Boev 1972 (42) presentaron los resultados de ensayos múltiples de infección experimental en ratón de parejas simples, demostrando la compatibilidad o aislamiento reproductivo entre triquinellas aisladas de animales salvajes de tres orígenes biogeográficos: a) en el extremo norte euroasiático; b) en áreas de clima templado europeo; c) la cepa africana aislada en una hiena del Kruger; y d) las comunes, largo tiempo mantenidas en el laboratorio, aisladas de cerdos domésticos. Al demostrar aceptables niveles de aislamiento reproductivo, propusieron la inicial división del género en tres especies:

Trichinella spiralis (Owen 1835) Railliet 1860, la especie sinantrópica aislada de cerdos y hombres,

Trichinella nativa Britov & Boev, 1972 n.sp., la que infectaba a mamíferos circumpolares altamente resistente a la congelación, y *Trichinella nelsoni* Britov & Boev, 1972 en honor al Dr. Nelson para la que por él y sus colaboradores habían descrito en Kenia infectando a los jóvenes Kikuyu. Este último fue precisamente su error, describieron una pretendida especie sin muestra alguna de la misma. Lo hacían con un aislamiento enteramente compatible con cepas de *Trichinella* aisladas de animales salvajes – lobos, zorros – en España e Italia. Describieron una especie con los datos de un aislamiento africano biológicamente – inter-fértil en ambas direcciones –, como más tarde comprobamos en varios laboratorios europeos, con aislamientos de *Trichinella* parasitando lobos, zorros, jabalís del occidente europeo.

En este mismo año 1972 el investigador veterinario Boris L. Garkavi describe una triquinella nueva aislada en la Región de Krasnodar en el Noreste del Cáucaso en un mamífero introducido a Eurasia, un mapache (*Procyon lotor*). Era una triquinella muy diferenciada: aparente ausencia de cápsula de colágeno alrededor de la larva muscular, tamaño menor tanto de las larvas musculares como de los adultos y lo que era más importante, capaz de infectar tanto a mamíferos como aves. La denominó *Trichinella pseudospiralis* (Garkavi, 1972).

El género *Trichinella* contaba ya con cuatro especies: *T. spiralis*, *T. pseudospiralis*, *T. nativa* y *T. nelsoni*. Se había abierto un nuevo panorama acogido entre lo que en esto nos ocupábamos, como suele ocurrir ante las novedades que rompen esquemas, con escepticismo por unos y entusiasmo crítico por otros.

Prosiguen las reuniones internacionales sobre *Trichinella*. En 1972 en Miami Beach, Florida, la ICT-3 homenajea al Prof. Gould, el gran iniciador de la investigación sobre *Trichinella*.

En 1976 volviendo a Europa, de nuevo en Polonia, Poznan, bajo la tutela del Dr. Z.S. Pawlowski, se reúne la ICT-4, en la que participamos por segunda vez junto con nuestra colaboradora Filo Rodríguez Caabeiro.

Nuestro grupo desde Santiago de Compostela en 1978 envía a Alma Ata (actualmente Almaty, Kazajistán) tres aislamientos hispanos. Por ensayos de hibridación identifican como *T. nelsoni* la cepa C-76 (43) aislada en 1976 de un lobo en Curtis, Galicia, y como *T. spiralis* la GM-1 aislada en 1964 de un gato montés en Pola de Lena (Asturias) (44), lo que comunicamos a la Sociedad Española de Parasitología (45). Lo propio hace el Instituto Superior de Sanidad de Roma el Dr. Mantovani. Así, identifican como *T. nelsoni* la cepa aislada en un zorro en Torano (Centro de Italia) sobre el Adriático.

En los Países Bajos, Noordwijk aan Zee, 1980, bajo la dirección del Dr. Joost Ruitenbergh, tuvo lugar la ITC-5 donde comunicamos trabajos que demostraban las considerables diferencias biológicas entre aislamientos nuevos, procedentes de animales salvajes, con las triquinellas de cerdos domésticos. Se aceptaba la división original de Britov y Boev identificándose en diferentes lugares de Europa la presencia de *T. nelsoni* sentido Britov y Boev. ¡Sorprendente!

En 1984 en Val Morin, Quebec, Canadá, bajo la organización de Charles E. Tanner, se celebró la sexta edición de la Conferencia Internacional, ICT-6, con dedicación preferente a la respuesta inmune de la triquinelosis, sin grandes objeciones en uno u otro sentido a la especiación propuesta por Brito y Boev, más Garkavi.

En este camino hacia el reconocimiento de la especiación del género contribuyeron significativamente dos ideas: que en la naturaleza además de morfo-especies, abundaban las especies ocultas, morfológicamente indistinguibles pero aisladas reproductivamente – especies gemelas – y que la personalidad de las mismas, inapreciable en su morfología o fenotipo, se hallaba en su genoma. La observación indirecta del genoma se podía visualizar analizando la expresión de enzimas fundamentales del metabolismo (Ayala y Powell 1972) (46). Siguiendo este avance experimental, la Dra Flockhart 1982(47)(48) inició el análisis comparado de alozimas de *Trichinella*, confirmando la existencia cierta de la especiación ya denunciada. En nuestro caso, después del envío a Londres de nuestras GM-1 y C-76, ésta confirmó que pertenecían a dos especies distintas (Flockart 1982) (49). Se extendió la idea, publicándose en Canadá, Japón y USA trabajos con la misma técnica, con la que se hallaban dos conclusiones comunes: por una parte, la naturaleza específica de *T. pseudospiralis*, por otra, las notorias diferencias entre triquinellas encontradas parasitando a

cerdos y las aisladas en la fauna silvestre: el polimorfismo enzimático, reflejo de las diferencias genéticas entre aislamientos, apoyaba la existencia real, aunque oculta, de especiación en *Trichinella*.

Edoardo Pozio, que va a ser el más destacado de los investigadores de la especiación de este nematodo, debuta(50) en 1987 examinando 23 aislamientos de Europa, África y USA con 10 sistemas de isoenzimas, comprobando que, aislados de Italia y Francia son idénticos al africano denominado *T. nelsoni* y a su vez diferentes a los de Polonia, USA, Holanda, considerados *T. spiralis*.

De nuevo, pasados 8 años desde la última reunión internacional, celebramos en Alicante, en 1988 la ICT 7 (Séptima Conferencia Internacional sobre Trichinellosis), bajo mi dirección y el apoyo del Prof. Francisco Bolás. En ella, Pozio y col.(51) presentaron el trabajo basal del reconocimiento de la especiación de *Trichinella*: la identificación bioquímica – mediante 25 sistemas gen-enzima – de siete grupos diferentes de especies en el género, inaugurando la denominación abreviada de T1 *T. spiralis* s.str (sentido estricto) ; T2 *T. nativa* Britov and Boev, 1972; T3 para *Trichinella* sp.3 de España, Italia, URSS; T4 *T. pseudospiralis* cepa Garkavi; T5 (*Trichinella* sp.5) de USA ; T6 (*Trichinella* sp.6) también de USA y *T. nelsoni* Britov et Boev 1972 pero en aislamientos nuevos de Kenia y Tanzania. Este trabajo surgió especialmente gracias a la idea de crear en 1988 en el *Istituto Superiore di Sanità* de Roma, el laboratorio de Referencia de la ICT (Comisión Internacional sobre Trichinellosis)(52), antes citada y en él, un banco de cepas de *Trichinella*. Así se hizo, e investigadores de España, Francia, Alemania, Polonia, URSS y otros de Europa y Asia, USA y Canadá, China... comenzamos a enviar a Roma cepas para el tipado isoenzimático. Hoy en día, el ITCR (gianluca.marucci@iss.it) cuenta

con un banco de cepas de alrededor 10.000 aislados humanos y animales del mundo entero.

Esta primera presentación de Edoardo Pozio y col. fue ampliada y universalmente aceptada en tres trabajos del grupo italiano: La Rosa et al. 1992(53) y Pozio et al 1992a(54) y 1992b(55). Se elevaron a la categoría de especie cinco de los grupos presentados en Alicante, así: *T. spiralis* (T1), *T. nativa* (T2), *T. britovi* (T3) como nueva especie, *T. pseudospiralis* (T4) y *T. nelsoni* (T7), así como tres genotipos innominados *Trichinella* T5, T6 (ambos en América del Norte) y T8 de la fauna de carnívoros del extremo sur y suroeste de África.

Lo que hacen Pozio et al. 1992 en su revisión taxonómica del género es, tras consultar en 1990 con los autores Dr.V.A. Britov y Prof. B. Shaikenov, conservar el nombre de *T. nelsoni* para la especie estudiada por Nelson y colaboradores en Kenia y que allí permanece como años más tarde, entre otros, comprobaron (56).

La denominación de T3 como especie *T. britovi* roza un tanto la Ley de la Prioridad del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica porque consideraron que, aunque los autores no dispusieron de ejemplares de la especie que denominaban, se referían sin duda a la que endémica en Kenia había sido bien estudiada natural y experimentalmente por Nelson, Forrester y Mukundi (16, 17, 18).

Por otra parte, la única triquina africana que usaron Britov y Boev, al hibridar libremente con cepas de la fauna salvaje europea, posiblemente la aislada en una hiena moteada en el Parque Kruger, - antes aquí citada - era un clado diferente que en honor al Dr. Vasily Andreevich Britov (1925-) se denominó *T. britovi* n.sp.

A partir de este tiempo, la Comisión Internacional sobre Trichinellosis designó como Centro Internacional de genotipado,

referencia y repositorio de cepas al ITRC (“International Trichinella Reference Center”) antes mencionado.

Las técnicas instrumentales de análisis de la especiación comienzan a asaltar el genoma del nematodo. A partir de 1985 se suceden los trabajos que aplican sucesivas técnicas de análisis de ADN reafirmando la especiación ya cierta y admitida de *Trichinella*: endonucleasas de restricción y sondas, así como análisis del ADN ribosomal, reacción en cadena de la polimerasa, amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD). Entre nosotros -Teresa Gárate et al 1991- (57) con endonucleasas de restricción y sondas, empleando la sonda LandaTsR1, detectan, utilizando 13 aislamientos hispanos, las diferencias específicas entre GM-1 *T. spiralis* y C.76 *T. britovi*.

En el ICT-8 celebrado en Orvieto, Italia en 1993 bajo la dirección de Edoardo Pozio y sus colaboradores se presentaron comunicaciones utilizando modalidades de PBR-RAPD. Nosotros, Arribas et al.(58), demostramos, al someter a la técnica 28 aislamientos de *Trichinella*, 19 españolas, de los cuales 15, procedentes de cerdos domésticos y jabalíes, pertenecían a *T. spiralis* s.st. y sólo cuatro a *T. britovi*. Por su parte, Bandi et al.(59) compararon con éxito los resultados del análisis RAPD con el clásico de alozimas, que venían haciendo hasta el momento.

La ICT-9, con el impulso y dirección de Guadalupe Ortega-Pierres, se celebra en la capital de México en 1996, posiblemente el más numeroso en asistencia y abundante en comunicaciones de los Congresos sobre *Trichinella* y trichinellosis. El capítulo de Sistemática de *Trichinella*: clasificación y especiación contó con 10 comunicaciones, varias presentadas por nuestro grupo.

En 1999 Zarlenga et al.(60) publican el método PCR multiplex de identificación segura de las especies y genotipos,

usando una mezcla de larvas o una sola larva. Método que se convierte en un estándar seguido por todos los dedicados a estas tareas en el mundo entero.

También por estas fechas Nagano et al 1999(61) identifican la variedad de *T. britovi* aislada de la fauna salvaje japonesa como un genotipo diferenciado y en Papua Nueva Guinea, I.L. Owen redescubre la segunda especie no encapsulada de *Trichinella*, a la que Pozio et al 1999(62) denominan *T. papuae* n.sp. parásito de reptiles y mamíferos.

Volviendo a Europa, en el 2000, bajo la dirección de Jean Dupoy-Camet, se celebró en Fontainebleau, el ICT-10. En este mismo año, aplicando ensayos de aislamiento reproductivo y las nuevas técnicas moleculares, Pozio y La Rosa 2000 (63) elevan a la categoría de especie como *T. murrelli* la presente en la fauna silvestre de la amplísima área de clima templado de Norteamérica, antes identificada como Genotipo T5.

Dos años más tarde (64) en la antigua Rhodesia del Norte, ahora Zimbabwe, el investigador local Sansom Mukaratirwa encuentra en cocodrilos nilóticos explotados como animales de granja, una triquina no encapsulada que experimentalmente infecta también a la raza porcina doméstica de la región y que se describe como *T. zimbabweensis* (65), tercera especie acapsulada.

En 2004 dirigido por Ray Gable y Judy Appleton se celebró la ICT-11 en San Diego, California. Con el consenso de la ya bien elaborada especiación de *Trichinella*, se presentó, entre otros el trabajo de D. S. Zarlenga, et al (64) de identificación y clasificación de las especies del género.

En 2007, de nuevo en Europa, en el idílico ambiente de Plivice Lakes, en Croacia, bajo la dirección de Albert Marinculić, se reunió la ICT-12 con abundantes comunicaciones españolas de

nuestro grupo utilizando la técnica molecular ISSR-PCR, sobre las variedades intraespecíficas de *T. britovi* en la península, así como de una aparentemente nueva *Trichinella* capsulada.

Como se analiza pormenorizadamente en otro capítulo de esta revisión, B. Rosenthal et al 2008 (66) demuestran, tras el análisis de una muy amplia nómina de aislamientos europeos, americanos y asiáticos, la alta uniformidad de *T. spiralis* de Europa y América fruto de un cuello de botella evolutivo en su llegada a Europa y de aquí al mundo entero con los imperios español primero y británico después. Todo ello en contraste con la gran variación genética de los aislamientos de la especie en Asia Oriental.

Había llegado el momento de que la Conferencia Internacional sobre Trichinellosis se reuniera en Asia y así se hizo en su decimotercera ocasión (ICT 13, Changchun, China, 1- 6 August, 2011), bajo la dirección de Mingyuan Liu bajo el lema: "Acercamiento sistemático a la prevención, control y erradicación de la Triquinosis".

Faltaba en este indagar por el mundo América del Sur, donde ya se había detectado por Rubén A. Binaghi la presencia de una triquinella en la fauna andina. Krivokapich y col 2012 (67) describen la presencia de la nueva especie *T. patagoniensis*, que parasita especialmente a los félidos andinos. Una especie autóctona además de las introducidas desde España y el resto de Europa: *T. spiralis* habitual, *T. britovi*(68) y *T. pseudospiralis*(69).

Bajo la dirección del Prof. Andreas Hensel "President Federal Institute for Risk Assessment (BfR)" se celebró en Berlín en 2015 la ICT-14, donde se expusieron los últimos trabajos de filogenia, biogeografía y análisis comparado de los borradores del genoma entero de las especies del complejo *Trichinella*.

Cuatro años más tarde, de nuevo en Europa, tuvo lugar en Cluj- Napoca, Rumanía, la conferencia decimoquinta (ICT-15) en agosto de 2019 bajo la dirección de Călin M. Gherman. Se presentaron comunicaciones interesantísimas como la de Zarlenga sobre “cianasa nuevo carácter” plesiomórfico de los Trichuroideos, testigo del origen por transferencia génica horizontal desde el hospedador vegetal al parásito endocelular que debió ser el ancestro de *Trichinella*. Así fue publicado con posterioridad (18) y (19); así como la certeza de independencia entre las *T. spiralis* de China y las europeas occidentales. En su opinión, la uniformidad genética de *T. spiralis* en Europa no se debe a una mínima importación de cerdos chinos. El cuello de botella pudo deberse más bien a la domesticación de un pequeño grupo de jabalíes.

Parecería que esta historia de la radiación adaptativa de *Trichinella* está llegando a sus postrimerías. Esta impresión da el magnífico trabajo Korhonen et al 2016(15) en el que, tras la secuenciación y ensamblado del borrador de los 12 genomas de las especies reconocidas, reconstruyen la filogenia y biogeografía del género, completando y reafirmando así el trabajo en el mismo sentido 10 años antes de Zarlenga et al, 2006 (16).

La decimosexta conferencia Internacional sobre *Trichinella* (ICT-16) se celebró en Belgrado, Serbia, en 2023 bajo la dirección de la Dra. Ljiljana Sofronic-Milosavljevic. Fue de nuevo una conferencia “pacífica”, sin grandes anuncios, dedicada de nuevo a datos de faunística.

El último hallazgo, ya anunciado en el ICT-15, es la identificación en el glotón *Gulo gulo*, en el Noroeste de Canadá de la última especie válida, ***T-13*** denominada por el Dr. Sharma et al. 2020 (70) *T.chanchalensis*, una especie aparentemente arcaica, antecesor de todas las *Trichinella* distintas a las capsuladas sensibles a la congelación *T.spiralis* y *T.nelsoni*.

3 Capítulo 3. Trabajo propio 1.

El viaje a América y el parentesco de algunas triquinas

Trato aquí de enriquecer de modo original, con datos españoles y propios, aquellos publicados en un muy buen trabajo de Benjamin Rosenthal, et al. 2008 (66) en el que se analiza la dispersión humana de las especies de *Trichinella* comparando por proximidad genética 49 aislamientos procedentes de veintiocho países y cuatro continentes. Genotipa para cada aislamiento nueve *loci* de microsatélites y la secuenciación de una quinta parte de su genoma mitocondrial. En concreto, de *Trichinella spiralis*: 12 aislamientos españoles de cerdo y jabalíes, 12 de otros 10 países europeos, 15 de Estados Unidos, más dos de Argentina, uno de Egipto y uno de Canadá; más una muestra menor de seis aislados procedentes del Este asiático.

Comprueban la gran uniformidad entre las europeas, consecuencia de un hipotético cuello de botella evolutivo, en contraste con la intensa variabilidad de las muestras asiáticas. A su vez, demuestran molecularmente la procedencia europea de los aislamientos americanos de *T. spiralis*, lo que completamos y corroboramos aquí con datos propios. El considerable número de cepas españolas incluidas en el estudio nos permite extender y completar así los resultados del estudio arriba citado.

Con relación a *T. britovi*, nuestra otra especie de interés, sólo analizan cuatro aislamientos españoles. Pero podemos asociar

también los datos de la cepa italiana ISS02 cuya presencia entre nosotros hemos detectado(71)(72)y la T 8 sudafricana ampliamente incluida en trabajos propios (73). De este modo, pretendemos contribuir a conocer mejor las relaciones entre sí de los aislamientos de esta especie en la Península Ibérica.

3.1 Primera parte, referente a *T. spiralis*

Asociando los datos sobre cepas españolas en el trabajo mencionado con los nuestros acumulados a lo largo de años a través de las tesis doctorales de Teresa Gárate(74), Cristina de Armas Serra(75), Elena Albarrán Gómez(76) Begoña Arribas López (77) y Flery Fonseca Salamanca (78), se obtienen resultados importantes que permiten un conocimiento mejor de las poblaciones de *Trichinella spiralis* presentes en España y en su día aisladas de cerdos y jabalíes.

En la tabla 1 se resume la denominación, hospedador, origen e investigador responsable de los aislamientos españoles de cerdos y jabalíes en el intervalo 1988 a 1992, enviados desde el “International Trichinella Reference Centre data base” (Roma)(22) que identifican Rosenthal et al. (66). Aunque concentrados en el Suroeste de España, son una buena muestra de las triquinellas que parasitan a jabalíes y cerdos, especialmente criados en régimen de montanera - pastoreo libre en las dehesas –.

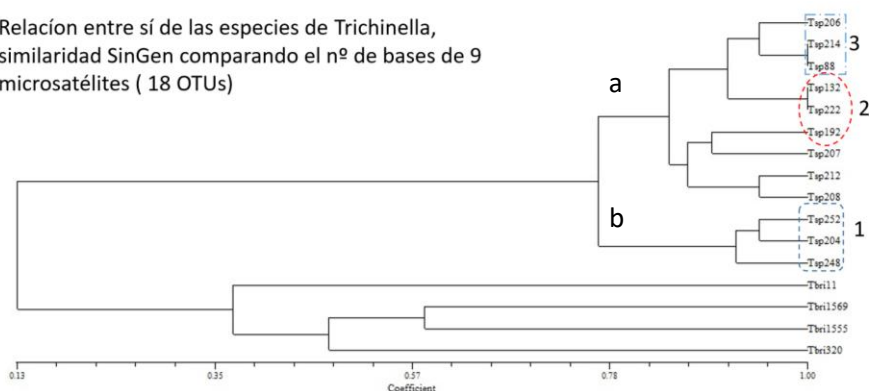
TABLA 1. Relación de aislados españoles incluidos como *Trichinella spiralis* en Rosenthal, B. et al 2008 (66), enviados por el Instituto Superiore di Sanita, Roma desde *Trichinella Database*.

ISS nº	año	Hosp.	Localidad de aislamiento; Investigador que envió la muestra
206	1991	Cerdo	Cilleros, provincia Cáceres; Prof. Ignacio Navarrete (1)
192	1990	Cerdo	Montes de Toledo, Toledo; Prof. Francisco Bolás (2)
132	1982	Jabalí	Hormachuelos, Córdoba; Prof. Antonio R. Martínez (3)
222	1991	Cerdo	Valencia de Alcántara, Cáceres; Prof. Ignacio Navarrete (4)
207	1991	Jabalí	Alia, Cáceres; Prof. Ignacio Navarrete (5)
252	1992	Jabalí	Aroche, Huelva; Prof. Ignacio Navarrete (6)
248	1992	Jabalí	Carrascalejo, Cáceres; Prof. Ignacio Navarrete (7)
212	1988	Cerdo	Plasencia, Cáceres; Prof. Ignacio Navarrete (8)
204	1990	Cerdo	Guijo de Granadilla, Cáceres; Prof. Ignacio Navarrete (9)
208	1988	Cerdo	Santiago del Campo, Cáceres; Prof. Ignacio Navarrete (10)
214	1990	Cerdo	Castañar de Ibor, Cáceres; Prof. Ignacio Navarrete (11)
88	1977	Jabalí	Córdoba, Córdoba; Prof. Antonio R. Martínez (12)

ISS. Número del aislamiento en el Banco del ISS Roma (<http://Trichinella.ISS.it<Database>. Nombres locales de los aislados: (1) Cilleros 1; (2) Toledo; (3) Horma; (4) Valencia 91; (5) Alia 91; (6) Huelva 92; (7) Ibor 92 ; (8) Pla 88; (9) Jijo 90; (10) Campo 88; (11) Nueva; (12) C-77. Nota: ISS 248 e ISS 252 fueron identificada porPCR- RAPD en 1992 (79) como *T.britovi*; ISS 204 fue asimismo identificada por alozimas (47) como *T.britovi*.

Con el conjunto formado con las longitudes en número de pares de bases que proporcionan los nueve microsatélites estudiados, construimos una matriz, mediante la herramienta NTSYS pc para Windows, incluyendo también en el análisis los aislamientos españoles de *T. britovi*, probando de este modo la relación entre sí de los aislamientos españoles y su destino y paso a América (Figura 3).

Relación entre sí de las especies de *Trichinella*,
similaridad SinGen comparando el nº de bases de 9
microsatélites (18 OTUs)



1. Son aislamientos hispanos tan próximos a *T. britovi* que en el banco ISS están identificadas por alozimas como *T. britovi*
2. Aislamientos iguales a estos de cerdos y jabalís de Cáceres y de Norte de Córdoba se aíslan en Norteamérica de Opossum 1 Murrell et al.1985 y Raccun 2 ídem
3. Aislados muy diferenciados, próximos a aislados de Serbia y Finlandia

Figura 3. Relación entre sí de aislamientos de *T. spiralis* deducida de la similaridad entre nueve microsatélites. Pag Análisis NJ (Neighbor Joinig) (“asociación de vecinos”) sin raíz, de similaridad, de aislamientos hispanos de *T. spiralis*.

Se aprecia una original separación de nuestras *T. spiralis* (*Tsp*) en dos grupos bien diferenciados a y b; por una parte, las que forman el grupo 1 y por otra el resto de los aislados examinados. Este grupo 1 cuenta a su vez con dos ramas, una la más antigua con un solo representante (ISS 248 aislada de un jabalí en Cáceres) y derivada de ésta, dos muy próximos entre sí ISS 252 de Jabalí, Huelva e ISS 204 de cerdo en Cáceres. Por un curioso nexo se asocian estos tres aislados distintos entre sí por dos procedimientos diferentes: por alozimas y PCR- RAPD se etiquetaron en el ISS como *T. britovi*. Ahora, en este análisis más amplio de Rosenthal et al (66) pasan a considerarse cepas de *T. spiralis*.

En este caso, aunque en los datos no aparecen huellas de introgresión, es decir: “movimiento de genes de una especie a otra a consecuencia de una hibridación seguida en generaciones posteriores de retro-cruzamientos” - cruzamientos de los híbridos con una u

otra de las especies madre-, sí están en la proximidad de otras europeas que sí los muestran (Serbia ISS 599) en el dendrograma del conjunto de cepas examinadas por Rosenthal et al (66).

La introgresión sí parece que se denuncia en nuestro ISS 248 (jabalí, Cáceres). Efectivamente, ISS248 con huellas de un pasado cruzamiento con una cepa china, se separa de todas las demás *T. spiralis* qué en su día, por alozimas, fueron identificados como *T. britovi* (11) (Figura 4).

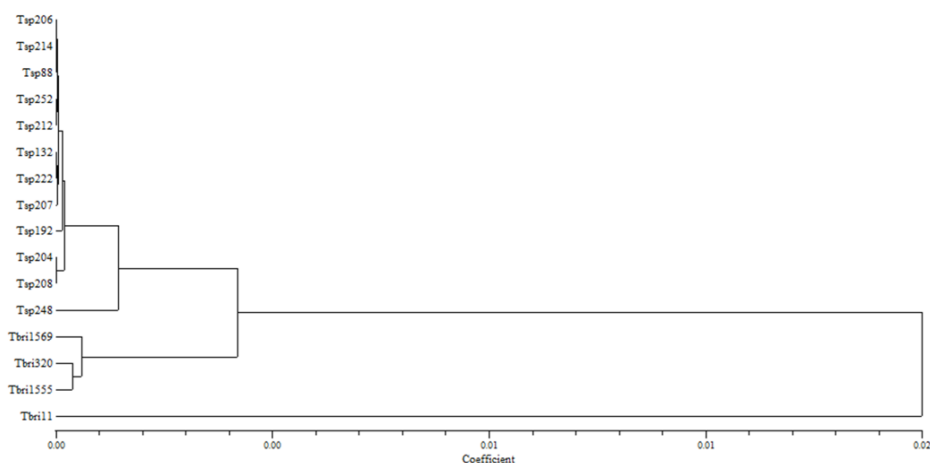


Figura 4. Separación, según origen de hospedador de los aislamientos hispanos de *T. spiralis*.

También Rosenthal et al. (66) vienen a demostrar la gran uniformidad de *T. spiralis* de Europa y América frente a la variabilidad extrema observada en los pocos aislamientos asiáticos orientales analizados, lo que juzgan puede deberse a una única llegada primigenia desde Asia a Europa que sufrió además un cuello de botella evolutivo (80) que estrechó su variabilidad ahora observada.

Como alternativa a la anterior, en el dendrograma de Rosenthal et al (66), aislamientos como ISS Francia 186 (más

próxima que ninguna de las europeas examinadas a ISS 154 de Egipto y ISS 186 de Tailandia) apuntan también a la hipótesis de una segunda venida a Europa de *T.spiralis* desde el Sudeste asiático como originariamente fue propuesto por Piekarski (81) a través de las importaciones de cerdos por los hibridistas creadores de las razas porcinas europeas mejoradas durante el siglo XIX²

El segundo grupo de aislamientos hispanos (Figura 2), incluye por una parte (enmarcadas como 2 en nuestro dendrograma en la Figura 2) algunos de los que recientemente describimos como trasladados a América (82) y un grupo (3 en el dendrograma) de genuinas europeas, circulando en mamíferos salvajes en España, Serbia, Finlandia.

Las trasladadas a América las analizamos ahora más pormenorizadamente al añadir nuestros datos sobre estos aislamientos, en este afán de enriquecer los resultados del excelente trabajo de Rosenthal, B. et al. (66). Con el fin de apreciar simplificada la proximidad o alejamiento de los aislamientos (*cepas* para simplificar) consideramos como 100 los $9 \times 2 = 18$ pares de bases.

La cepa española **ISS 207** aparece en el dendrograma de Rosenthal, pag 2 como la originaria de las otras tres: Austria ISS 102, Polonia ISS168 e Ill-1 (Gamble and Murrell, 1986) de USA. Su

² La formación de la **raza Berkshire (hacia 1770)** se produce cruzando cerdos Berks con cerdos importados de Myanmar (Birmania) y China. El éxito de la raza Berkshire fue extraordinario exportándose desde Inglaterra hasta Norteamérica tan pronto como en 1823. Las exportaciones se realizaron a otros lugares del continente.

La formación de otras razas inglesas siguió el mismo camino por ejemplo la **longe black de East Anglea** (Devon y Cornwall) hacia 1800 con los cerdos chinos de capa negra.

También en el continente: raza de Baden-Württemberg, **Swabian-Hall** mejorada hacia 1820-21 con la importación de cerdos chinos de la raza Meishan.

proximidad con esta última es del 94,4 %, mientras que sólo alcanza un 88,8 % con cualquiera de las otras dos. Parece por ello que este grupo de cepas: Austria, Polonia, USA Ill-1 tienen todas el mismo origen, al igualarse con la española 207 en el mismo 94,4 %. Parece que la cepa norteamericana aislada de un cerdo procede la ISS207 que llegó a América desde España.

Otras dos cepas españolas: la **ISS 132** procedente de un jabalí cazado en Hormachuelos, Córdoba, que denominamos en su día HORMA, que incluimos entre las cepas españolas de alta prolificidad como C-77 y POLE y que, en los primeros pases de laboratorio a través de ratón CD-1 fue capaz de hibridar parcialmente con *T. britovi* C-76 (ISS11), aunque sólo en el sentido macho Horma x hembra C-76 (Arribas, B.(8)) y Figura 4 (Patrones de hibridación de aislamientos españoles). Esta cepa es en Rosenthal 100% igual a la también española **ISS 222** encontrada en un cerdo en Valencia de Alcántara, Cáceres. Además, las dos son 100 % iguales a las aisladas de fauna salvaje en USA: *Opossum* Murrell et al 1985 (una zarigüeya, marsupial de Norteamérica) y Racc 2 (Murrell et al, 1985) (un mapache, mamífero). Este conjunto de cuatro cepas prácticamente iguales está asociado a otro aislamiento norteamericano de cerdo llamado Dome et al 1987 con el que coinciden en un 94,4 %. En conclusión, uno de estos dos aislamientos españoles, entre sí iguales, ISS 222 o ISS 132 viajó a América del Norte y fue capaz de asilvestrarse pasando a mamíferos y marsupiales endémicos en el área y, tras alguna ida y vuelta de los ciclos epidemiológicos doméstico y salvaje, se naturalizó en el nuevo espacio ecológico. Llegó muy probablemente durante la formación de la raza Duroc tan característica del Cinturón del maíz: Iowa, Illinois, Indiana y Nebraska oriental, Kansas oriental, Minnesota meridional y partes de Misuri (82).

Otra cepa española **ISS 252**, aislada de un jabalí en Aroche, provincia de Huelva en 1982 es 100 % igual a la ISS 229 aislada de un zorro en USA y a su vez tampoco se diferencia de la ISS 405 aislada de un cerdo en Argentina. Una triquinella que circula en el extremo Sur-Este de la península fue llevada tanto al Norte de América – asilvestrada hora - como al Sur de América. Es poco probable que haya sido transportada con cerdos domésticos dos veces, *lo más lógico es pensar que* fue una vez a Mesoamérica, que es la parte de América que primero se coloniza y desde allí se expandió al Sur de América y al Norte, donde se asilvestró.

La española **ISS 248** difiere de la española ISS 252 por conservar en el microsatélite 3 una huella juzgada como introgresión, ya que está también presente en un aislamiento chino. En el resto es igual tanto a la otra cepa española como a la del zorro en USA y el cerdo en Argentina (94,4%). Con la cepa eslovaca ISS147, además de la mencionada diferencia en el microsatélite 3, cuenta con otro medio microsatélite diferente, homología de sólo un 88,8 %. Aunque en Rosenthal se asocia con estas dos españolas, el acercamiento con la más próxima ISS208 es de sólo un 72,2 %. Están próximos pero aparentan ser tres aislamientos diferentes.

Prosiguiendo con el dendrograma publicado por Rosenthal et al (66), la presencia de una cepa aislada en cerdo en Argentina ISS 404 asociada en un grupo próximo a las aisladas de jabalíes introducidos en USA, nos indujo a valorar si también estas triquinellas procedían indirectamente de España, es decir, dada la conocida llegada a USA de jabalíes procedentes de Argentina y éstos, a su vez, de Europa en el XIX.

Este análisis deparó alguna sorpresa. En primer lugar, la escasa diferencia entre los aislamientos norteamericanos de jabalí WB-133 y NA-035. Asimismo, también parecen tener el mismo

origen la pareja NA-037 y NA-036. Sin embargo, entre cualquiera de las dos primeras y de las segundas, hay una doble diferencia en el microsatélite 8 (sólo un 88,8% de coincidencia). Esto significa que ha habido al menos dos entradas diferentes de *Trichinella* en USA por esta vía. El resto de las observaciones de nuestra parte no arrojan luz sobre su origen. Por una parte, la primera pareja (HB133 y NA-035) difiere de la cepa próxima Argentina ISS 404 (sólo 77,7 % de coincidencia), acercándose más la segunda pareja (Na-035 y NA-037) (88,8% de coincidencia). Por su parte, la cepa argentina, también es diferente, al mismo nivel, de la próxima Dinamarca ISS26 que se acerca modestamente a la canadiense PB4 (Dame et al 1987). También difiere muy significativamente de la otra hispana, analizada más arriba, ISS 132 denominada por nosotros como Horma, muy posiblemente trasladada a Méjico y Argentina antes de la llegada a la península en el XIX de nuevas *T. spiralis* de mayor adaptación y prolificidad en cerdos domésticos.

Otro aislamiento hispano ISS 212 es un verso suelto. Su más próximo, Eslovaquia ISS 174, de zorro, sólo comparte el 88,8 % al diferir en la totalidad del microsatélite 8. Por otra parte, su también vecino ISS 328 de un cerdo de Suecia, está aún más alejado (72,2 %).

Finalmente, las hispanas ISS 214 e ISS 088 son distintas aunque próximas (94,4 %). Su vecina, Serbia ISS 599 aislada de caballo se aleja (88.8) al diferir en el microsatélite 6 en su totalidad. Posiblemente es otro ejemplo de introgresión ya que este microsatélite 6 uniforme en todas las demás *T. spiralis* analizadas, es diferente en todas las *T. spiralis* asiáticas, así como en *T. britovi*, *T. murrelli* y *T. nativa*.

Curiosamente ISS088 es nuestra CO-77, que en origen debió ser una mezcla de *T. spiralis* y *T. britovi*. Cuando Francisco Martínez

desde Córdoba (CO-77) la envió a Alma-Ata, fue identificada como *T. nelsoni* (ahora denominada genotipo T8 de *T. britovi*)³.

La bondad de los datos que exprimimos del trabajo mencionado, con relación a los aislamientos de *T. spiralis* procedentes de Extremadura –Cáceres- y Andalucía –Córdoba- se ejemplariza también en la imagen del dendrograma de similitud hecho por nosotros a partir de la matriz formada por la longitud en pares de bases de los nueve microsatélites publicados por Rosenthal et al (66) (Figura 5). Curiosamente se refleja en el dendrograma el origen de los aislamientos, de cerdo doméstico y jabalí, en buena parte separados.

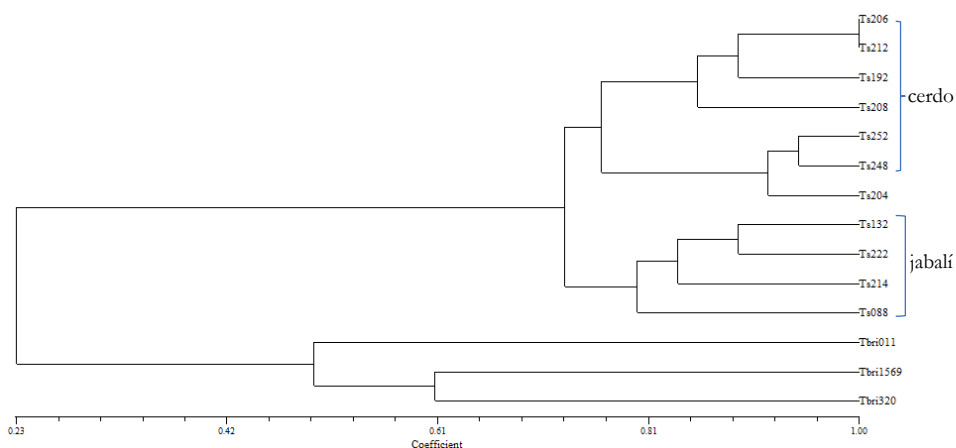


Figura 5. Relación entre sí de aislamientos de *T. britovi* deducida de la similitud entre nueve microsatélites.

³ Con la aplicación estricta del Código de Nomenclatura zoológica, la prioridad del nombre dado por Britov y Boev en 1972 al aislamiento procedente de una hiena del Parque Kruguer como *Trichinella nelsoni*, en honor a Nelson, a lo que resultó ser un genotipo de la especie predominante en cánidos suinos eurasiáticos salvajes. Esta aplicación sería tanto como elevar a categoría un error: Britov y Boev no tenían en sus manos la triquina que había causado el brote en los jóvenes kikuyos en Kenia estudiada por Noelson y col., Forrester y col. loci. cit. Por esta causa, no se ha puesto en duda la decisión de Pozio describiendo las dos especies simpátricas en África: *T. nelsoni* sensu stricto y T8.

3.2 Segunda parte, referente a *T. britovi*

Aunque son muy pocos los aislamientos españoles de *T. britovi* incluidos en esta publicación seminal, cuatro, véase Tabla 2, — frente a los 11 de Italia, 7 de Francia, 5 de Estonia y 12 de otras áreas europeas —, sí nos sirven si se suman a los datos de ISS 002 que también se encuentra entre nosotros, y T8 ISS 124 interfértil con la mayoría de nuestras *T. britovi*. Se confirma la notoria variedad en todos salvo uno de los microsatélites observados, lo que ocurre también con las muestras, más pequeñas de las otras especies *T. nativa* y *T. murrelli*. No incluye *T. britovi* en América dado que el hallazgo en Argentina (68) es posterior. Es una pena pues, de lo contrario, hubiéramos tenido la probabilidad de demostrar, como ocurre con el aislamiento Argentina ISS 405 de *T. spiralis*, su probable origen español.

TABLA 2. Relación de aislados españoles incluidos como *Trichinella britovi* en Rosenthal, B. et al 2008(66), enviados por el Instituto Superiore di Sanita, Roma desde el *Trichinella* Database

ISS n°	año	Hosp.	Localidad de aislamiento; Investigador que envió la muestra
11	198	Lobo	Curtis, La Coruña; Prof. Antonio R. Martínez Fernández (1)
1569	204	Jabalí	Bohonal de Ibor, Cáceres; Prof. Serrano Aguilera
320	1992	Jabalí	Arganda, Madrid; Dra Esperanza Rodríguez
1555	2004	Jabalí	Ladrillar, Cáceres; Prof. Serrano Aguilera

ISS. Número del aislamiento en el Banco del ISS Roma (<http://Trichinella.ISS.it<Database>). (1) Primer aislamiento de esta especie en España, originariamente por hibridación de parejas simples se denominó *T. nelsoni*. Es nuestra especie tipo de *T. britovi*, llamada C-76 en el Registro Internacional de Especies, antes de constituirse la *Trichinella* Data Base en el ISS, Roma.

En la tabla 2 se resume, el origen y lugar en España de los aislamientos de *T. britovi* incluidos en análisis genómico de Rosenthal. En el dendrograma que publican se observa que, frente

a la gran uniformidad de *T. spiralis*, *T. britovi* cuenta con al menos tres troncos diferenciados. En el primer se incluyen, tanto nuestra C-77 de un lobo como la ISS 002 de un zorro en Italia. Son las primeras que biológicamente – ver en el capítulo siguiente, aislamiento reproductivo y dinámica de infección experimental –, primero y, por el resto de los procedimientos posteriores, se identificaron como diferentes a *T. spiralis* ya desde 1972 en nuestro caso(83)(45).

Las dos *T. britovi* típicas de España C-76 e Italia ISS 002 son prácticamente iguales en todos sus microsatélites analizados. Es de resaltar, lo que se puede deber al origen común o algún tipo de introgresión posterior a la separación geográfica causante de especiación (alopatrismo) que esta *T. britovi* cuenta con microsatélites que se repiten en *T. murrelli* en el 1, 2, 3 y 6 y en el dos 1 y 5 con *T. nativa*. Se manifiesta mayor proximidad con *T. murrelli* que con *T. nativa*, lo que es bien curioso ya que *T. britovi* y *T. murrelli* en el tiempo presente se hallen en áreas geográficas alejadas – Eurasia y Norteamérica –, mientras que *T. britoi* y *T. nativa* se encuentran en áreas euroasiáticas solapadas.

Los microsatélites 7, 8 y 9 se repiten iguales en todas las *T. britovi*, y, por tanto, parecen patrimoniales de esta especie.

El segundo grupo del árbol de Rosenthal (66) (Figura 1, página 806) está encabezado por nuestro ISS 1569 de un jabalí de la sierra de los Iborees en Cáceres. Aunque se aproxima a ISS 138 de zorro en Francia y al ISS 241 de perro en Italia, difiere en los pares de bases de 5 microsatélites con ambos aislamientos, que además, entre sí difieren en parte en siete de los microsatélites. Son en todo diferentes.

Respecto al tercer grupo, por una parte está el español ISS 320, que no tiene relación alguna con sus vecinos aquí examinados.

Difiere con la más próxima ISS 351 de Francia en cuatro microsatélites enteros y en la mitad de otros dos.

Si a los datos genómicos de las muestras procedentes de España, se añaden la ISS 02 italiana también circulante en España, y el genotipo africano T8 que en otro lugar mostramos que es una *T. britovi* desplazada recientemente – en términos geológicos - a África, y la norteamericana *T. murrelli*, podemos hacer un análisis más sencillo, en un árbol sin raíz (Figura 6).

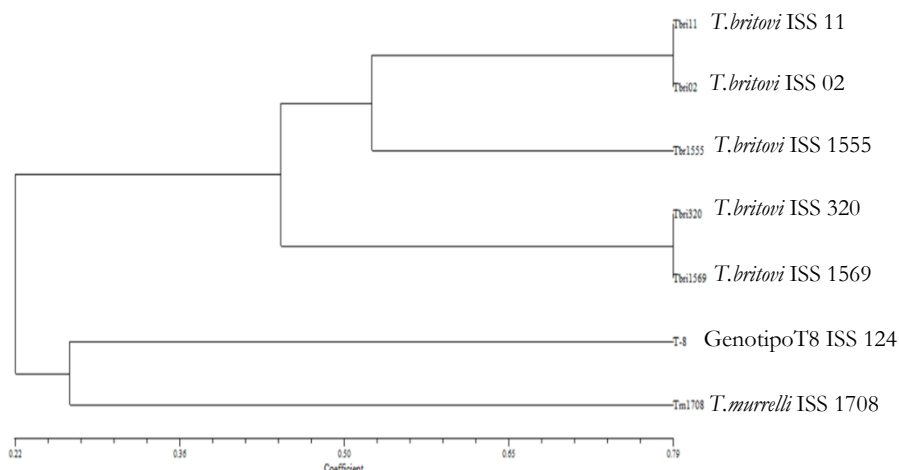


Figura 6. Relación de similaridad, SinGend, a partir de la matriz del número de bases de nueve microsatélites de Rosenthal et al. 2008 loc.cit (66).

Se observa así mejor la gran proximidad entre sí de los dos aislamientos de *T. britovi* C-76 ISS 11 española y la ISS 002 italiana, que curiosamente fueron los primeras triquinellas de esta especie encontrados en España e Italia, a su vez próximos a ISS 1535 y, en conjunto, subsidiarios de las otras dos españolas estudiadas: ISS 320 y ISS 1569. También, lo que es muy significativo, el alejamiento temprano del Genotipo T8 africano y la especie norteamericana *T.*

murrelli ISS 1708 , ¿un reflejo de lo que en tiempo geológico se especula que ocurrió?. Sí, también así parece.

De este escarbar en y con nuestras herramientas y conocimientos concomitantes los aislamientos españoles de *T. britovi* aquí vistos, se reafirma la gran variedad de esta especie en nuestra península, extremo occidental de Eurasia y depósito por ello de emigraciones empujadas por las olas sucesivas de glaciación características del Cuaternario – véase el final del siguiente capítulo.

Tampoco se ha encontrado en este análisis de dónde partió *T. murrelli*. Sí parece indicarse que el genotipo africano T8 partió de un ancestro común de aislamientos europeos actuales como el español ISS 1555 y los kazako ISS 179 y francés ISS 348.

4 Capítulo 4. Trabajo propio 2.

4.1 Pequeña historia de nuestra relación con *Trichinella* spp.

El título del capítulo es impreciso, en él, el adjetivo “nuestra” oculta el pronombre “nosotros”, un conjunto de los que conmigo fuimos conociendo mejor este nematodo: Manuel Sanmartín, Filomena Rodríguez Caabeiro, Teresa Gárate, Francisco Bolás, Cristina de Armas, M^a Elena Albarrán, Alicia Gómez Barrio, M^a Begoña Gómez Novillo, Flery Fonseca Salamanca, de forma directa, junto con otros muchos: Felipe Bárcena, Francisco Martínez, Ignacio Navarrete, Caridad Sánchez Acedo, Rufino Álamo Sanz, S.N. García Sánchez, Esperanza Rodríguez de las Porras, Marta Barral, y un largo etc. Y en la distancia del inicio en este quehacer: Miguel Cordero del Campillo, Francisco Rojo Vázquez.

Comenzó mi contacto experimental con *Trichinella* en 1963 al mismo tiempo que lo hacía con la Parasitología como ciencia y asignatura a impartir; así fue, como profesor novato enseñando y estudiando al tiempo en aquella Facultad de Veterinaria de León, por aquel entonces perteneciente a la Universidad de Oviedo, donde me había licenciado. Conté para mi formación como parasitólogo con dos maestros: en lo personal, con Miguel Cordero del Campillo que justo hacía un año había alcanzado la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de aquella facultad; en lo biológico, con este raro nematodo causante de una zoonosis a la que la profesión veterinaria en Europa debe su papel social relevante como garantes de la salubridad de la carne y productos

Tiabendazol
4 - (1-*H*-1,3 benzodiazol-2-yl) -1,3-tiazol

COCCc1cccnc1/C=C/c2ccsc2N3CCN(C)CC3CN1CCCN=C1/C=C/c2ccc(O)cc2ClCCOP(=O)(ClCCO)c1ccc2c(c1)c(C)c(Cl)c(=O)o2CCCC1=CC=C2C(=C1)N=C(NC(=O)OC)N2O=C1NC(=N2C=CC=C(C=C2)S(=O)(=O)c3ccccc3)N=C1NC(=O)Nc1ccc(cc1)S(=O)(=O)c2ccccc2CCCOc1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C(=N1C(=O)OC)N1

62

Nuestra herramienta era la cepa GM-1 encontrada parasitando un gato montés cazado en Pola de Lena (Asturias) y enviada por un colega, Veterinario Titular de aquel municipio, el Dr. D. Manuel Rodríguez García, excelente profesional y divulgador científico. Ya desde el comienzo de nuestro trabajo, mi profesor de parasitología, antes citado, tenía claro que *Trichinella*, además de ser la causante de la zoonosis evitable con la inspección veterinaria de los cerdos domésticos, estaba en el medio silvestre en otros carnívoros y carroñeros. Así se recogieron, por primera vez en España, datos de la presencia del nematodo en la fauna salvaje en áreas de la Cordillera Cantabro-Astúrica de nuestra proximidad. Datos que presentamos a la segunda conferencia internacional sobre trichinellosis: ICT-2 en Wroklow (Polonia) (International Commission on Trichinellosis; <http://www.trichinellosis.org/Conferences.html>), posteriormente publicados (98); que se resumen en la Tabla 3 adjunta,

Tabla 3. *Trichinella* sp. en la fauna salvaje en la Cordillera Cantabro-Astúrica (1960-69).

Trichinellosis in sylvatic animals from the Cantabrian Mountains (Between the provinces of León and Asturias) (1960-1969)			
Species	Number of specimen	Positive to <i>T. spiralis</i>	Percentage
Badger (<i>Meles meles</i>)	5	2	40.0
Genet (<i>Genetta genetta</i>)	18	7	38.8
Fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	60	19	31.6
Wildcat (<i>Felis sylvestris</i>)	19	6	31.5
Ferret (<i>Putorius furo</i>)	8	2	25.0
Wolf (<i>Canis lupus</i>)	5	1	20.0
Baum marten (<i>Martes martes</i>)	18	1	5.5
Squirrel (<i>Sciurus vulgaris</i>)	4	0	
Otter (<i>Lutra lutra</i>)	2	0	
Weasel (<i>Mustela nivalis</i>)	1	0	
Wildboar (<i>Sus scrofa fera</i>)	1	0	
Mole (<i>Talpa europaea</i>)	6	0	

El interés por conocer la presencia de triquinella en la fauna salvaje se extendió a otros centros donde se hacía parasitología en el país, especialmente las cátedras de las facultades de Veterinaria de Córdoba y Zaragoza, así como la Escuela Nacional de Sanidad integrada posteriormente en el Instituto Carlos III, que proseguirían años más tarde, con mucho éxito estas tareas.

4.2 Aislamientos y biología diferencial

Sirviendo desde 1972 a la Universidad de Santiago de Compostela, establecimos contacto con el biólogo local Felipe Bárcena Varela de Limia, noble y Noble, infatigable zoólogo de campo, máximo conocedor entre nosotros del lobo en la Península Ibérica. Gracias a su colaboración comprobamos que entre 1975 y 1977 en los que analizamos muestras de lobos cazados en las cuatro provincias gallegas, el 99 % estaban infectados con *Trichinella*. En dos ocasiones, procedentes de la misma zona, una montaña (Sierra Lobera, Curtis) aislamos y comenzamos a pasar periódicamente por ratón NMRI las cepas de *Trichinella* que denominamos C-76 – por Curtis en 1976 – y C-77. Estos dos aislamientos y nuestra veterana GM-1 fueron enviados al Laboratorio del Prof. Boev a Alma Ata para su identificación específica mediante entrecruzamiento de parejas simples de larvas musculares. El resultado de estas experiencias (43)(44), que nunca supimos donde fue publicado, se resume en la siguiente tabla cuatro que transcribe la comunicación personal del grupo de investigadores del laboratorio del Dr. Boev (Tabla 4).

Tabla 4. Transcripción de las comunicaciones de Shaikenov et al.1980 de la identidad de GM-1 y C-76 en Almatí, Kazajistan (43, 44).

1.Experiencias de identificación de los aislamientos C-77 y C-76			
MODELO DE REPRODUCCION larva 0 x larva 0	Nº.ANIMALES INFESTADOS (*)	Nº.ANIMALES POSITIVOS	% de CRUZAMIENTO
C-76 x <u>Trichinella nativa</u>	10	0	-
C-76 x <u>Trichinella spiralis</u>	10	0	-
C-76 x <u>Trichinella nelsoni</u>	10	3	42,8
C-76 x C-76	10	8	75,0

C-77 x <u>Trichinella nativa</u>	10	0	-
C-77 x <u>Trichinella spiralis</u>	10	0	-
C-77 x <u>Trichinella nelsoni</u>	13	8	61,5
C-77 x C-77	10	7	70,0

2.Experiencias de identificación del aislamiento GM-1			
GM-1 x <u>Trichinella nativa</u>	9	0	-
GM-1 x <u>Trichinella nelsoni</u>	15	1	6,6 (+)
GM-1 x <u>Trichinella spiralis</u>	14	7	50,0
GM-1 x GM-1	8	6	75,0
(*)Se indican sólo los animales que sobrevivieron hasta el final de la experiencia. (+) <u>T.spiralis</u> híbrida con <u>T.nelsoni</u> (sic) en una pequeña proporción con descendencia estéril. Las experiencias 1. fueron realizadas por B.Shaikenov y Larisa A.Sokolova; las experiencias 2. por B.Shaikenov y Z.Ch.Tazieva.			

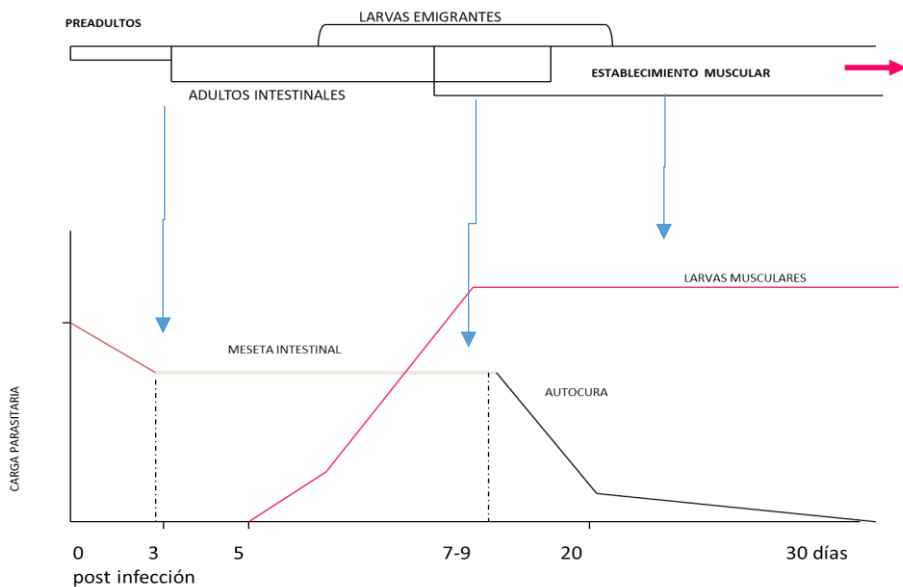
Unos excelentes resultados del ahora lejano 1975. Se debe aclarar que consideraban como *T. nelsoni* la cepa procedente de una hiena moteada cazada en el Parque Nacional Kruguer, antes comentado. La identificación de C-76 con *T.nelsoni* Brito & Boev,1972 sería posteriormente confirmada en nuestro laboratorio por los métodos biológico y moleculares y por La Rosa et al (79) como el primer aislamiento que se produjo en España de *Trichinella britovi* Pozio et al 1992, especie distinta reproductivamente aislada

de las dos especies admitidas ya en este tiempo: *T. spiralis* y *T. nativa*. Esta fue la primera evidencia de que en Galicia circulaba en los lobos una especie diferente de este género de nematodos.

Por otra parte, también por primera vez se constata que nuestra cepa GM-1 era un aislamiento de *T. spiralis*, que como en otros lugares endémicos había pasado del ciclo epidemiológico urbano ya demostrado hacía cerca de 60 años por Virchow(26), a un ciclo silvestre entre carnívoros salvajes en la cordillera.

El informe del grupo del Prof. Boev tuvo un punto difícil de interpretar que se repitió con el envío desde Córdoba por Francisco de Paula Martínez Gómez con otro aislamiento, en este caso de jabalí, el denominado CO-77. Tanto nuestra C-77 procedente de un lobo, como CO-77 de jabalí se identificaron como *T. nelsoni* (finalmente *T. britovi*), aunque por alozimas (99) y técnicas posteriores se comprobó que eran dos cepas asilvestradas de *T. spiralis*. Es posible que estos dos aislamientos fueran en principio infecciones naturales mixtas; años más tarde, tras 15 años y unos 60 pases en ratón, sólo quedó su componente *T. spiralis* y así fue determinado por análisis isoenzimáticos y genómicos posteriores.

Fijamos en el laboratorio, consecuencia de nuestra experiencia con la evaluación de la actividad antihelmíntica de moléculas de síntesis sobre las diferentes fases del ciclo biológico de *Trichinella spiralis*, un esquema nominado del ciclo que se expresa en la figura adjunta donde se definen y establecen parámetros que se corresponden con situaciones permanentes en el ciclo endógeno de la infección parasitaria (Figura 8).



Se definen y establecen parámetros tales como:

- Pérdida inicial = cociente inóculo / n° adultos al 3° dpi (día post infección)
- Meseta Intestinal = n° estadísticamente estable de adultos que permanecen en el intestino
- Autocura, fenómeno inmunológico de expulsión; cambio en el cociente sexual
- Ritmo bimodal de puesta de embriones
- ICR o relación entre el n° de larvas inoculadas y el n° total de larvas musculares

Figura 8. Esquema de las fases observables en el ciclo biológico de *Trichinella* spp.

Siguiendo este esquema se estudió el comportamiento biológico de las dos especies gemelas, que presentamos en el ITC 5 (Noordwijk aan Zee, Holanda). Los comportamientos biológicos de estas dos especies, que se muestran diferentes, por primera vez (100) se resumen en la Figura 9.

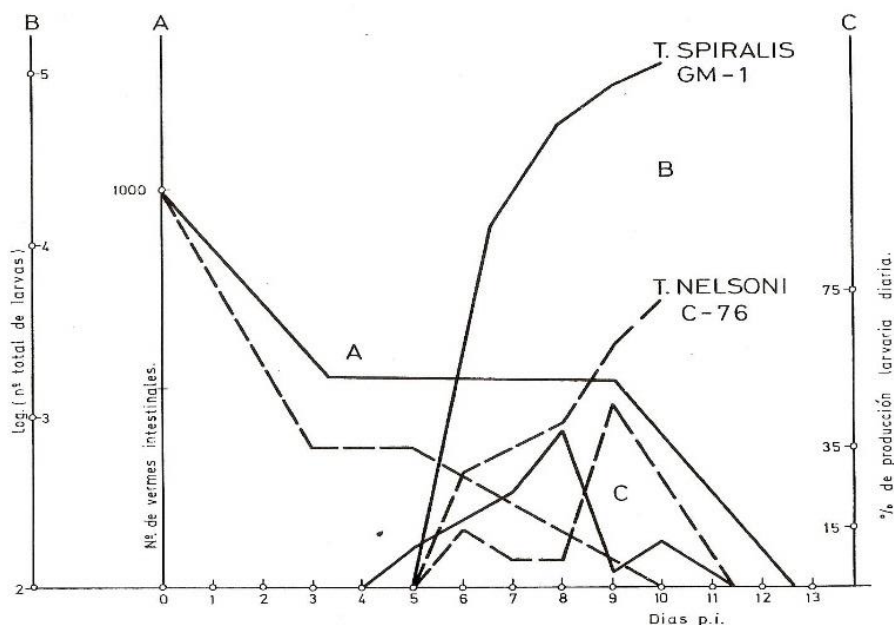


Figura 9. Parámetros biológicos comparados entre dos aislamientos de *Trichinella* GM-1 de gato montés y C-76 de lobo.

Mediante infecciones de ratas CD (Charles River) observando los parámetros biológicos establecidos: *pérdida inicial* al 3° día post infección (p.i.); duración en días de la *meseta intestinal*; *autocura*, día p.i. en que el número de hembras de nematodo disminuye estadísticamente. Como se puede observar, el comportamiento biológico de C-76 (en éste tiempo llamada *T. nelsoni*, futura *T. britovi*) es muy diferente al de GM-1 (*T. spiralis*).

En esta representación gráfica de comportamiento endógeno de estos dos aislamientos, ambos procedentes de fauna salvaje, se evidencia que pertenecen a especies diferentes. La rata, el hospedador experimental elegido, con sólida respuesta inmunitaria, evidencia con mayor claridad esta circunstancia.

Asimismo, gracias al uso de un antihelmíntico que solo actúa sobre los adultos intestinales se determinó para cada aislamiento de

Trichinella el ritmo diario de larviposición, es decir, el ritmo de puesta de embriones (larvas recién nacidas) en cada día de la permanencia intestinal. Se demostró así, por primera vez entre nosotros, la existencia en la naturaleza de dos especies biológicamente diferentes. La cepa C-76 sufría una pérdida inicial muy alta (se establecía solo el 36% frente al 52% de GM-1 *T. spiralis*), la meseta intestinal era muy corta (tres días), la autocuración adelantada y consecuentemente una infección muscular muy diferente (155 larvas /g de tejido muscular para C-56 frente a 1.943 de *T. spiralis*).

Contábamos con dos especies autóctonas diferentes, por lo que buscamos ampliar el ámbito de la presencia de *Trichinella* en nuestra fauna salvaje. El problema era justificar la presencia en los lobos de Galicia de una “triquina africana”, como nos decían desde Alma Ata. Lo comunicamos a la Sociedad española de Parasitología (SEP)(45) y en la discusión aventuramos hipótesis divertidas, como atribuir a la venida desde África de félidos al Circo Romano.

Gracias a la colaboración de los profesores Francisco de Paula Martínez Gómez de Córdoba y Caridad Sánchez Acedo de Zaragoza, más las remitidas por S.N Boev desde Alma Ata y Kjos Hanssen desde Noruega logramos una colección inicial de cepas:

- Tres cepas de cerdo doméstico: LASO, aislada de un cerdo doméstico en La Solana, Ciudad Real en 1959 y mantenida en el Instituto López Neyra de Granada; POLE aislada en 1974 en Pola de Elena (Asturias) y SEVILLA aislada en esta ciudad homónima en 1983, ambas también de cerdos domésticos.
- Cuatro de Jabalí: CO-77, aislada en Córdoba en 1987; HORMA, en la localidad de Hormachuelos (Córdoba), QUINO, (también llamada OVINO o JAB-82) de la

provincia de Córdoba, MAD-83 aislada también de Hormachuelos, Córdoba en 1983;

- Tres de zorro: MONEGRILLO de un zorro cazado en esta localidad en 1984, ARRONIZ también de zorro, con el nombre de la localidad donde fue cazado en 1984, y BOEV, cepa de *T. nativa* procedente de un Zorro cazado en Mordovia (Rusia Central) y enviada por el Prof. S.N. Boev del Instituto de Zoología de la Academia de Kazajistán (Alma Ata).
- Dos de Lobo: C-76 lobo cazado en 1976 en Sierra Lobera, Curtis, La Coruña, C-77 de la misma localidad, un año más tarde.
- Una de cada una de las especies siguientes:
 - . Una cepa Garkabi, de *Procyon lotor*, es decir la especie consolidada *T. pseudospiralis*, enviada por el Dr. Z.S. Pawlowski desde Poznan al Instituto López Neyra y de éste a nuestro laboratorio;
 - . Dos cepas de *T. nativa* NORUEGA de un oso polar (*Thalarctus maritimus*) cazado en Swalbard que había sido conservada a -18°C durante 24 meses, en la cabeza del oso infectado. Nos la envió el Dr. Kjios Hanssen en 1981 Posteriormente, enviada a Roma, se le asigna el identificador ISS10; la segunda cepa de *T. nativa*, aislada originariamente de un zorro en Kazajistán, nos la enviaron desde el laboratorio del Prof. Boev; remitida posteriormente a Roma, se le asignó el identificador ISS76.

4.3 Aislamiento reproductivo de parejas simples

En la Figura 10 se ejemplariza el dimorfismo sexual discreto que tiene el primer estado infectante de *Trichinella*, a la izquierda la imagen microscópica 10X de una pareja, el macho con asa intestinal y la larga cloaca(recto), a la derecha la larva hembra: primordio genital con células separadas, recto corto, gónada e intestino paralelos. A la derecha, dibujo esquemático del dimorfismo.



Figura 10. Morfología diferenciada de los J1 (larvas 1) infectantes de *Trichinella* spp.

Formando parte de la extensa tesis doctoral realizada por Cristina de Armas Sierra(75), de nuestro grupo de investigación en Santiago, en el capítulo de identificación de aislamientos mediante compatibilidad o aislamiento reproductivo por ensayos de infección con parejas simples, comprobó que nuestra tipo de *T. spiralis* GM-1 está: a) aislada reproductivamente de C-76, de Garkabi y de las dos nórdicas Boev y Noruega. Sorprendentemente, para ese año, 1985, también está aislada MAD-83 – sólo en F1 un 20 % en la dirección ♂ GM-1 x ♀. Por otra parte, es completamente compatible con:

HORMA, SEVILLA, LASO, QUINO y POLE, que eran por lo tanto de la misma especie.

Por su parte C-76 está aislada al 100% con GM-1, LASO, SEVILLA, QUINO, ARRONIZ; es capaz de hibridar, sólo en la dirección ♂ C-76 x ♀ HORMA y lo mismo con C-77.

La cepa MONEGRILLO es 100% compatible con C-76, es por lo tanto como vamos a saber más tarde, la segunda *T. britovi* que identificamos.

Finalmente, las dos cepas “nórdicas” NORUEGA y BOEV, además de entre sí, hibridan con F1 viable con MAD-83 y CO-77 la primera y con MAD-73 y POLE la segunda. El comportamiento de CO-77 que en Alma Ata fue identificado como *T. nelsoni* (sentido Britov & Boev 1972 loc.cit) y que en este proceso experimental es capaz también de hibridar con QUINO y MAD 73 con F1 viable, es propio de que este aislamiento de un jabalí es una mezcla de dos especies, como más tarde, al utilizar alozimas y métodos genómicos, comprobaremos.

Otro tanto, más llamativo todavía es el caso de MAD-83 que no hibrida en el ensayo de pares simples con GM-1 y C-76 - como si no tuviera en su seno ni *T. spiralis* ni *T. britovi* y sí es compatible, con F1 viable, con NORUEGA, BOEV y Co77. Por ello, MAD-83 y Co-77 ambos de jabalíes, tienen un componente común de otro origen, sin descartar o con la posible base genética de *T. spiralis*.

MAD-83 en el tiempo en que se hacen las experiencias de hibridación, tras 9 años mantenida en condiciones de laboratorio aparenta ser todavía una mezcla de especies. Lo más curioso del resultado de estos ensayos es que dos aislamientos altamente resistentes a la congelación, que posteriormente se identifican supuestamente como pertenecientes a la especie *T. nativa*, hibridan en ambas direcciones con el aislamiento MAD-83. Pero además,

con el aislamiento POLE de cerdo, que es sin duda una *T. spiralis*. El problema de estos resultados es la incertidumbre de saber si las dos supuestas *T. nativa* de las que disponíamos eran realmente de esta especie o aislamientos resistentes a la congelación de *T. britovi*, lo que eraparece más probable. Por esta razón, unos años más tarde, volvemos a ensayos de compatibilidad o aislamiento por empleo de infección experimental con parejas simples, lo que para seguir un criterio cronológico abordamos en páginas posteriores.

Una buena pregunta es si esta mezcla se puede mantener en el tiempo. La experiencia con MAD-83, en las condiciones de laboratorio, indican que no.

Aunque no caen enteramente en el campo de este trabajo, se realizaron en este tiempo, 1975 a 1985, dos tesis doctorales: las de Manuel L. Sanmartín Duran(101) y Teresa Gárate Ormaechea(74) que contribuyeron significativamente en el entendimiento de la especiación de *Trichinella*- en aquel tiempo- a través de ensayos de inmunología experimental. En uno de los trabajos presentados en 1980 a la ICT 5 celebrada en Noordwijk aan Zee, Holanda (102) se publicaron resultados sobre inmunización por infección simple o hiperinmunización por infecciones abreviadas por antihelmíntico entre las especies identificadas en aquél tiempo: *T. spiralis* representada por la cepa GM-1, *T. nelsoni* representada por la cepa C-76 - de la que ahora sabemos es interfértil con la cepa Kruger que Britov y Boev denominan así, *T.nelsoni* , así como *T. pseudospiralis* cepa Garkabi. En las experiencias de hiperinmunización se halló que la obtenida con *T. spiralis* protege al 99% frente a una reinfección homóloga, así como en un 93% frente a la infección por C76 y un tanto menos, 42,8% frente a *T. pseudospiralis* si se consideran los adultos intestinales, así como, consecuentemente protección del 99 % de larvas musculares en la infección homóloga y del 88 % en la de C-78 y 46 % en *T.*

pseudospiralis. Por otra parte, no hay una especial diferencia entre C-76 y la *T. nativa* que manejamos, por lo que empezamos a sospechar que no es una especie particularmente distinta, en comportamiento al menos, a nuestra C-76, lo que un tiempo después se comprobó por hibridación de parejas simples dada su interfertilidad con C-76 y Monegrillo, dos cepas de fauna salvaje española que se asignarán con certeza a la nueva especie *T. britovi*.

Por el contrario, tanto en las experiencias de hiperinmunización por infecciones intestinales repetidas y abreviadas, como en infecciones completas, demostramos que C-76 y ésta supuesta “*T. nativa*” no protegen hasta el nivel de impedir una infección posterior con *T. spiralis*. Asimismo, la especie *T. pseudospiralis* protege al 100% frente a la reinfección con otras especies.

Aunque lo buscado era reafirmar, a través de diferencias de comportamiento, la separación oculta de las especies de *Trichinella*, surgieron dos datos importantes desde el punto de vista epidemiológico, que es muy posible que hayan sido, a partir de esta publicación, conocidos por otros autores que las recogieron en artículos de revistas indexadas sin citar, que sepamos, este trabajo publicado en el libro ITC 5 Trichinellosis, ISBN0 906544 04 1. Dichos hallazgos fueron:

1. Que las especies cabeceras aparentes del proceso evolutivo: *T. spiralis* y *T. pseudospiralis* son altamente inmunógenas, impidiendo por ello que el hospedador que las adquiere primero sea susceptible a una nueva infección por otra especie de triquinella; en sí, parece una vía secundaria de aislamiento aun en simpatrismo, facilitando la conservación de la especie.

2. Que otras especies, en este caso la representada por C-76 y la “*T. nativa*” enviada por Boev, – posiblemente otra que más tarde se denominará *T. britovi*– no inducen inmunidad suficiente como para impedir una nueva infección por otra especie del mismogénero.
3. La segunda circunstancia facilita que en la naturaleza haya infecciones mixtas, por ejemplo, en suinos salvajes, infecciones de *T. britovi* y *T. spiralis* ; concretamente esto, en áreas endémicas para las dos especies, ocurre con frecuencia y muy posteriormente se comprobó sin duda, cuando se pudo determinar la especie con el DNA de una sola larva (103).

Desafortunadamente, el comportamiento extraño en las pruebas de hibridación de parejas múltiples condujo a afirmaciones incorrectas negando el aislamiento reproductivo y por ende la especiación. También se puede dar en los ensayos repetidos de hibridación de parejas simples, aunque es más difícil. Por todo ello, por primera vez entre nosotros, Teresa Gárate Ormaechea, una de las más brillantes alumnas de las que he sido mentor, de feliz recuerdo, terminaba las conclusiones de su voluminosa tesis doctoral con las siguientes palabras que transcribo:

“Con respecto al rango taxonómico de las *trichinellas* examinadas observamos:

- a/ No son iguales los distintos aislamientos paleárticos que estudiamos, y no lo son cuantitativamente.
- b/ No están suficientemente alejadas entre sí, como para considerarlas especies plenas en el sentido de MAYR (62).
- c/ Tenemos argumentos para pensar que *Trichinella* ha sido sorprendida por nuestros estudios, entre otros, en un

camino intermedio hacia la especiación, superior ya al “círculo de razas” (Rassenkreise, Rensch(104)) e inferior al círculo de especies (Artenkreise Rensch (46)). Por todo ello considerarlas, como ya fue postulado, especies crípticas o hermanas, puede ser una solución de compromiso”.

Palabras juiciosas especialmente por haber sido escritas en 1982, temprano por lo tanto en el camino de desentrañar y entender el proceso de especiación de éste género de nematodos “perezoso”, que se quedó muy atrás en el proceso evolutivo de otros nematodos, por alcanzar temprano – en tiempo geológico – un estatus “cómodo” en el seguro de fiar su continuidad en el hábito vital de sus hospedadores: depredación y carroñerismo; a lo que se añade su escasa especificidad (polixenismo de su ciclo autoheteroxeno). Todo ello traducido en un ejemplo de cuasi-estasis evolutivo.

4.4 Análisis isoenzimático

Ya desde 1979 conocíamos, por el trabajo experimental que se desarrollaba en el Departamento de Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas –sito en el mismo edificio donde estaban nuestros laboratorios en Santiago–, el análisis indirecto del genoma por la observación de enzimas básicos, métodos asequibles que podíamos emplear para mejor conocer nuestros nematodos. No fue posible la colaboración porque ambos partimos de Santiago, él, Catedrático de Genética a su Cataluña natal, nosotros a Madrid.

Conocimos que la Dra. Flockhart lo estaba haciendo en Londres y le enviamos algunos de nuestros aislamientos, confirmando que GM-1 y C-76 pertenecían a especies claramente diferentes, como ya se ha comentado con anterioridad (49).

Desafortunadamente, cambió la Dra. Flochhart su trabajo y nos ofreció, entre a otros, su colección de cepas.

A partir de 1983, Pozio et al. (52) comenzaron a recoger aislados de *Trichinella* enviadas desde distintas áreas del mundo entero, especialmente de Europa y muy destacadamente de España. Este grupo italiano, perfeccionando la técnica de crioconservación en N₂ líquido de larvas recién nacidas, pudieron, en principio, almacenar y conservar cepas de *Trichinella*, al tiempo que normalizaban la denominación de los aislamientos, adoptando el sistema sugerido para los protistas quinetoplástidos (*Trypanosoma*, *Leishmania*) por la OMS (1984); así, nuestra cepa de *Trichinella spiralis* GM-1 pasó a llamarse en el banco internacional italiano MFEL/SP/62/ISS48 , que significa: mamífero/ *Felix catus*/1962/ número 48 de la colección en el ISS (*Istituto Superiore di Sanità*, Roma). El éxito de la iniciativa es memorable y a él y a un buen trabajo, se debe el especial protagonismo del grupo italiano en el conocimiento y desarrollo de *Trichinella*.

Desde los 80 del siglo pasado comenzamos a enviar periódicamente los aislados que recogíamos desde Madrid nuestro compañero Francisco Bolás y nosotros, y el investigador veterinario Gustavo del Real (Escuela Nacional de Sanidad), así como Ignacio Navarrete y sus colaboradores desde Cáceres, Santiago Hernández desde Córdoba, Caridad Sánchez Acedo desde Zaragoza, Granada, etc. con lo que los aportes desde la península fueron en principio los más numerosos en el repositorio. Los investigadores italianos perfeccionaron el análisis isoenzimático de modo significativo – véase la Figura 11 tomada de La Rosa et al.1992 (99) y Pozio et al. 1988 (47).

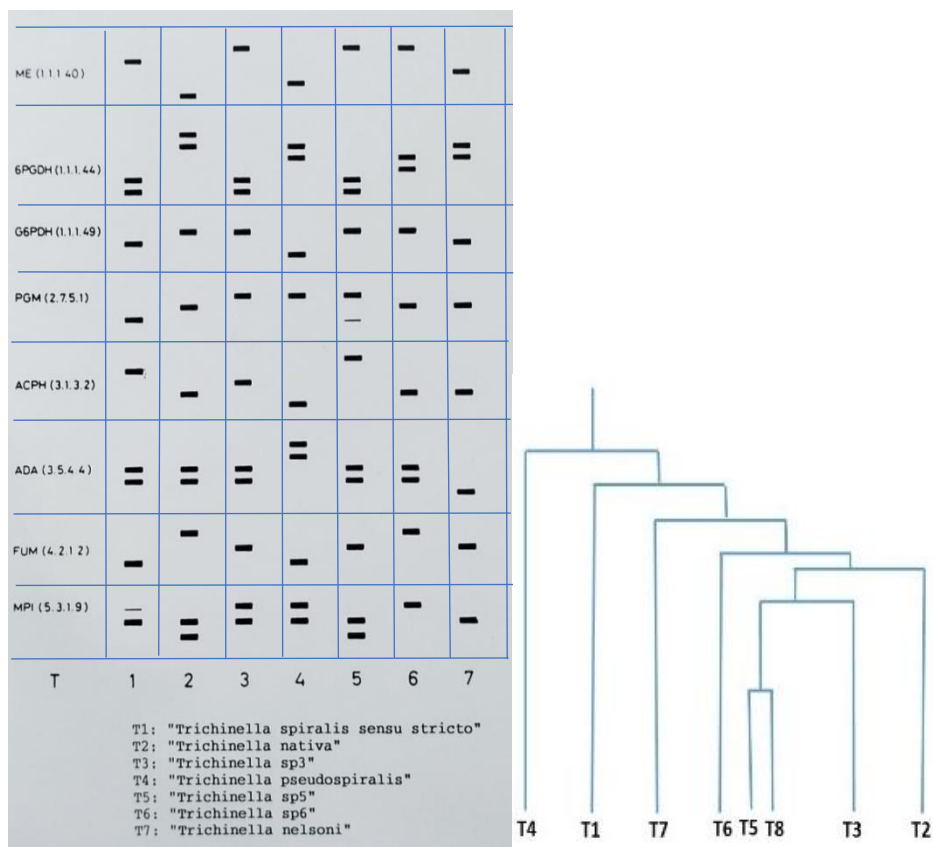


Figura 11. A la izquierda isoenzimas analizados que diferencian claramente los clados T1 a T7 analizados. A la derecha, dendrograma simplificado.

En la que se muestra a la izquierda(51) las isoenzimas analizados que diferencian claramente los clados vistos, denominados: T1 *T.spiralis* s.st., T2 *T.nativa*, T3 *Trichinella* sp3 de Italia, España, T4 *T. pseudospiralis*, T5 *Trichinella* sp5 de Norteamérica de clima templado, T6 *Trichinella* sp6 de Norteamérica, alta montaña y Norte del Continente, T7 *Trichinella nelsoni*, T8 *Trichinella* sp8 de fauna Sudafricana. El dendrograma de la derecha, simplificado para esta ocasión del original (41), separa netamente las triquinellas acapsuladas (T4) de las restantes capsuladas, parásitos sólo de mamíferos. Las dos siguientes son las

nada resistentes a la congelación: T1 (*T. spiralis*) y la T7 de los félidos y feloideos del Este africano. Es esta la primera observación de la proximidad entre sí de estos dos aislamientos distanciados en el espacio ecológico; alopatrismo hipotéticamente forzado por una glaciación. La hipótesis dominante es que las que no huyeron del enfriamiento con los hospedadores a África y al extremo Oriente eurasiático, se adaptaron al frío: al frío extremo la actual T2 (*T. britovi*) y la norteamericana T6, al frío moderado T3 (más tarde nominada *T. britovi*). De este último tronco, las dos que con sus hospedadores alcanzan áreas de clima más cálido, perdiendo en buena medida la resistencia a la congelación, son T8 y T5 lo que sucede en áreas tan alejadas como el Suroeste de África, en el caso de T8, y el Centro y Sur de Norteamérica en el de T5.

Este trabajo, presentado antes en Alicante, en la ICT 7 que nosotros dirigimos, era tan novedoso que a todos nos sorprendió, incluso a los autores que lo presentaron y publicaron “con modestia”, cuando era en realidad un buen adelanto. Los avances tecnológicos de observación directa del genoma lo confirmaron una veintena de años más tarde. Este trabajo se hizo en una buena parte con aislados de triquinella enviados a Roma desde Madrid. Concretamente, se incluyen y así se identifican por primera vez a nivel de especie las siguientes:

Como T1 *Trichinella spiralis* s.st.: GM-1 ISS 41 de un gato montés; POLE ISS90 y LASO ISS 112 de cerdo; CO-77 ISS88 y MAD-83 ISS92 de jabalí; ARRONIZ ISS91 de zorro; además una cepa de laboratorio, suponemos aislada por el Dr. Vasallo Matilla, de rata de alcantarilla en Madrid ISS 116. Como *Trichinella* sp3, nuestra C-76 ISS11 de un lobo en Galicia y Monegrillo ISS86 de un Zorro en Monegros, Zaragoza. Finalmente, aunque, foráneas, como trabajamos con ellas en este tiempo y luego se pierden, se incluyen como *T. nativa* las que en este tiempo así usábamos: NORUEGA

ISS10 procedente de la cabeza de un oso blanco cazado en Svalbard, y como T8 la ISS 124 de una hiena y la cepa LONDON ISS25 de *T. spiralis*, aislada de un gato doméstico en esa ciudad.

Como ya fue mencionado en el capítulo 2, tras los trabajos publicados por el grupo italiano -La Rosa et al. 1992(53) y Pozio et al 1992a(54) y 1992b(55)- queda claro que en la fauna peninsular circulan dos especies distintas: *T. spiralis* y *T. britovi*. Además está la descrita, con excesiva modestia por Rafael Calero et al. 1978(105) y (106), *T. pseudospiralis* parasitando a un águila ratonera del parque zoológico Tempul de Jerez de la Frontera (Cádiz) – *aunque se puso en duda* – reduciéndola a una sospecha - esta denuncia(107), de modo totalmente injustificado, alegando que no se identificó por medios bioquímicos, biológicos o moleculares; consideramos que es una alegación ridícula. Se utilizó el método más habitual – digestión péptica – y los autores, profesores veterinarios de parasitología sabían bien como era una triquinella y el hospedador, un ave rapaz. Es sin duda la primera denuncia de *T. pseudospiralis*; sólo años más tarde se repitió este hallazgo en España, Gerona(108), en un jabalí cazado cerca de la frontera y cercano a un foco francés. Desafortunadamente, se insiste en este trabajo en ningunear el primer hallazgo antes comentado.

En un salto cualitativo del afán de identificar las especies de *Trichinella* que circulaban en la naturaleza en nuestro país, merece la pena citar literalmente la primera de las conclusiones de la tesis doctoral que dirigimos a María Elena Albarran, 1989(76) “ Del estudio del polimorfismo del ADN de aislamientos hispanos de *Trichinella* mediante hibridación del ADN genómico y análisis de las secuencias repetitivas tras hibridación con una sonda específica de triquinellas quísticas (capsuladas), se desprende que los aislamientos analizados pueden agruparse en dos poblaciones: una encabezada por el aislamiento tipo GM-1 y otra formada por los aislamientos

C-76 y Monegrillo. Esta diferenciación corrobora los resultados de otros autores y técnicas tales como: por polimorfismo isoenzimático(53), hibridación con parejas simples(109), mapas proteicos(110), actividades enzimáticas(111) y(112), patrones de “western blot”(113)”. Es decir, se distingue mediante la técnica molecular de hibridación del ADN nuclear con una sonda específica para triquinellas capsuladas y análisis de las secuencias repetitivas, la presencia entre nosotros de *T. spiralis* como GM-1 y de *T. britovi* como C-76, modelos del estudio”.

4.5 Aislamiento reproductivo 2.

Con el trabajo minucioso de Begoña Arribas Novillo, como parte de su excelente tesis doctoral(114), volvimos a estudiar mediante la técnica de hibridación con parejas simples, la ya abundante muestra de aislamientos españoles de *Trichinella* procedentes de: cerdos domésticos (seis aislamientos), jabalíes (43 idem), zorros (10), lobos (uno) junto con los nueve aislamientos ya previamente contrastados de *T. spiralis*, dos de *T. britovi*, dos de *T. nelsoni* s. st., dos de *Trichinella* sp.6 de Norteamérica, uno de *Trichinella* sp.5 también de Norteamérica y uno de un oso blanco del zoo de México. Entrenamos previamente la selección de las larvas a infectar normalizando todos los aspectos: edad de la infección, técnica de aislamiento de larvas, sexado siguiendo la sugerencia de Ooi 1984(115), así como, inoculación con sondas desechables, resultados de la infección en el mismo tiempo post infección. Se tuvo especial cuidado en el reconocimiento de las larvas macho, eligiendo exclusivamente las que presentaban asa intestinal e introduciendo en cada ensayo de hibridación dobles controles positivos de cada cepa en la que se demostraba su compatibilidad o aislamiento en ambas direcciones, macho por hembra y viceversa, con las dos triquinellas tipo: GM-1 por *T.*

spiralis y C-76 como *T. britovi*. Los resultados parecen muy interesantes: los 6 aislamientos procedentes de cerdo fueron de *T. spiralis*. Entre los 43 aislamientos procedentes de jabalíes: 38 fueron de *T. britovi* y cinco de *T. spiralis*, con lo que se demuestra también aquí, con cepas aisladas principalmente de Castilla/León, el paso desde el ciclo epidemiológico urbano al silvestre, demostrado ampliamente en otros medios y ya patente desde el principio entre nosotros – así, nuestro tipo de *T. spiralis* GM-1 se aisló originariamente de un gato montés, y otra típica de Galicia, C-77 de un lobo. Todas las procedentes de carnívoros salvajes, 10 de zorro y 3 de lobo fueron *T. britovi*; esta es la especie endémica de nuestra fauna en el Centro y Norte de la Península.

Veáse Figura 12 en la que se indica en el mapa peninsular la localización geográfica de donde procedían los aislamientos, coincidentes en su mayoría con las cordilleras: Central y Montes de Toledo, Ibérica y especialmente la Cantabro-Astúrica, además de montes de Galicia y cinco de Andalucía; así lo resumimos en una imagen que muestra aislamientos y cordilleras en la Península Ibérica en un texto de parasitología con nuestro maestro Miguel Cordero y sus discípulos – Fig. 27-11, página 503 (116).

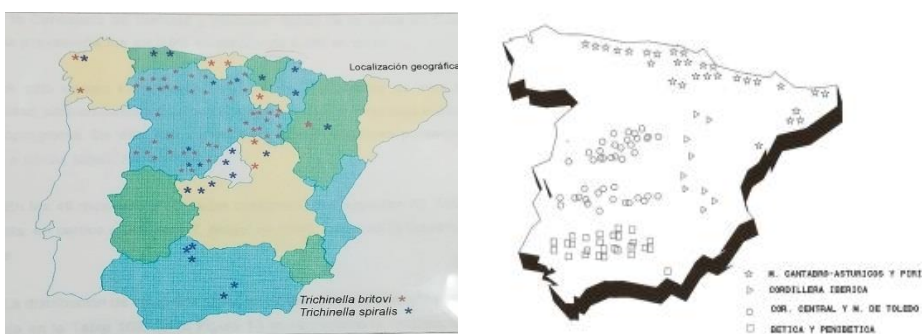


Figura 12. A la izquierda aislamientos estudiados principalmente de Castilla y León (114). A la derecha esquema de la situación geográfica de brotes de triquinosis entre 1960 y 1990, aproximadamente (116). Dibujan las cordilleras peninsulares.

Parece que entre las 16 cepas de *T. spiralis* clasificadas hay entre nosotros ejemplares “antiguos”, como la cepa ARRONIZ, muy probablemente anteriores a la llegada con los cerdos europeos mejorados portando otras *T. spiralis* con mucha mayor infestabilidad como LASO ISS 112 con ICR casi tan alto como la cepa LONDON ISS 25. Estas antiguas, fueron las primeras que llegaron a México y Argentina, donde persisten. Es este otro indicio que complementa los indicados por nuestra parte como consecuencia del aporte original que, en el capítulo precedente, hemos aportado y analizado al trabajo –en buena parte con nuestros aislamientos– de Rosenthal et al. (66). Se puede afirmar que la conquista de América por *T. spiralis* se hizo, desde nuestra país, sin excluir la que se haya producido desde Inglaterra y Francia, en dos tiempos: a) en el XVI con cerdos hacia el Caribe y de aquí a México y el Oeste de USA primero y a Argentina un poco más tarde; b) en el XIX a través de la formación de la raza porcina Duroc, como así demostramos en el capítulo anterior y en un trabajo precedente(117).

Los ensayos de hibridación delimitaron tres grupos; a) los que sólo hibridaron con *T. spiralis*; dentro de éstas, algunas cepas recién aisladas procedentes de jabalíes: J-89, J2-90 y J3-90 hibridan también con *T. britovi* produciendo F1 infértil; b) aislamientos que sólo hibridan con *T. britovi*, y c) un único aislamiento Omexico que sólo hibrida con *T. nativa*.

Se destaca que el Genotipo T8 de Sudáfrica es inter-fértil con nuestra *T. britovi* tipo C-76, con descendencia fértil observada hasta la 4ª generación. A su vez es inter-fértil con la cepa tipo italiana ISS 02 de *T. britovi*. No hay aislamiento reproductivo, pertenecen a poblaciones diferenciadas por aislamiento geográfico, alopatrismo, pero sin tiempo suficiente de separación. El genotipo T8 está instalado en el tren de la especiación, sin haber llegado a la

distancia suficiente como para alcanzar el estatus de especie. Por el momento no es más que un genotipo geográficamente aislado del conjunto de los genotipos múltiples de *T. britovi* presentes en Europa y Norte y Noroeste de África. Como acertadamente destaca Arribas en 1996 (61) el hecho comprobado ahora arroja luz sobre el error inducido de considerar la presencia de *T. nelsoni* entre nosotros e Italia al realizar los primeros ensayos de hibridación realizados en Alma Ata, antes referidos. El grupo del Prof. Boev utilizó como *T. nelsoni* a un aislamiento de T8 procedente de una hiena naturalmente infectada en el Parque Kruger del Noreste de Sudáfrica. El aislamiento reproductivo de T8 con nuestra *T. spiralis*, confirma puntualmente lo hallado previamente por Orlov et al. (118) que describen mecanismos de destrucción de cigotos de hembras de *T. nelsoni* (así consideraban a un aislamiento de T8, es decir de *T. britovi*, véase antes) cruzadas experimentalmente con machos de *T. spiralis*.

Cuando, en el desarrollo de nuestro trabajo, se intentó la hibridación con auténticas *T. nelsoni* (ISS29 de Kenia e ISS 37 de Tanzania) el resultado fue negativo. Asimismo, también estos aislamientos de la auténtica *T. nelsoni* (T7) están aislados reproductivamente del Genotipo T8 de nuestro ensayo (ISS 149 de T8). El aislamiento procedente de una hiena del Parque Nacional Kruger que el Dr. Nelson envió al Prof. Kozar que al final era una T8, fue un hecho casual pues, años más tarde, se demostró que también en el Parque Kruger hay *T. nelsoni* s.st. además de *T. britovi* T8. Incluso se ha encontrado un león con una comprobada infección mixta de las dos especies Marucci et al. 2009(119).

Se resuelve por primera vez, lo que posteriormente confirma Maru Dea Ayuela(120) en su tesis doctoral con relación al aislamiento MAD 83 ISS92 que es ahora en 1995 tras 12 años de pases periódicos por ratón – alrededor de 40 pases – no más que

un aislado de *T. spiralis*—, no era así cuando se hicieron 10 años antes los primeros ensayos de hibridación abundante, con descendencia fértil, con un aislamiento que supuestamente era *T. nativa* (cepa BOEV). Deducimos ahora que la original MAD-83 era una doble infección de *T. britovi* y *T. spiralis*. Al parecer, el mantenimiento en ratón favoreció a la población de *T. spiralis* lo que se evidenció en el análisis hecho por La Rosa et al 1992 (50) por isoenzimas y se confirma ahora. Al mismo tiempo, ya no nos cabe duda que el aislamiento BOEV que por su resistencia a la congelación había sido considerado como *T. nativa* no era más que una *T. britovi*.

4.6 Infecciones mixtas experimentales

Las infecciones mixtas *T. britovi* y *T. spiralis* existen en la naturaleza como demostraron entre nosotros Rodriguez, E. et al. 2008(103) o Nokler et al. 2005 (68) entre *T. pseudospiralis* y *T. spiralis* en jabalíes respectivamente de Cáceres y Alemania; lo que ya, en ambos casos había sido reproducido experimentalmente por Gárate 1983(74) entre nosotros. Como fue indicado antes, en la infección mixta natural, la clave está en el primer encuentro: si se realiza con especies de menor capacidad inmunógena como *T. britovi* y *T. nativa*, que se sepa, es perfectamente posible una reinfección posterior con las especies de mayor capacidad inmunógena como *T. spiralis* o *T. pseudospiralis*. Lo que parece no ocurre en sentido contrario.

En la Figura 13 se muestra la imagen, compresión entre portaobjetos, teñida, de la infección experimental mixta de *T. britovi* encapsulada y varias *T. pseudospiralis* acapsuladas.

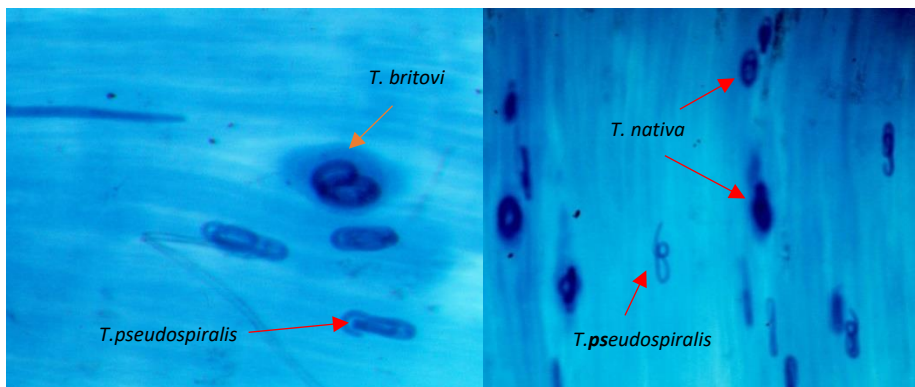


Figura 13. Compresión entre portaobjetos, teñida, de la infección experimental mixta de *T. britovi* encapsulada y varias *T. pseudospiralis* acapsuladas.

Además de la identificación de especie por aislamiento reproductivo de parejas simples, la resistencia a la congelación también es medida aceptable de especiación. Es harto conocido la diferente resistencia a la congelación dependiendo del tamaño del hospedador y el grupo zoológico (*Ursidos*, *Canidos*, *Felidos*) y la escasa en la infección experimental de un ratón. Para paliar esta circunstancia, normalizamos el ensayo de resistencia a la congelación empleando ratón (Arribas (61)), que consiste en esencia en la congelación de las canales evisceradas de ratón envueltas en papel de aluminio, **en cajas selladas de poliestireno**.

A tiempos de 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas se comprobó la viabilidad infectando un lote de ratones por cada tiempo, observando el número de adultos intestinales al 6º día post infección.

De este modo se distinguieron los aislamientos en tres grupos:

1. De baja resistencia, menos de 12 horas de congelación, todas las *T. spiralis* GM-1 y seis aislamientos de esta especie procedentes de jabalíes;
2. De cierta resistencia, 24 horas de congelación. Todas las *T. britovi* aisladas de jabalí, más curiosamente la *T. spiralis* J1-

93 parasitando también jabalí y la *T. spiralis* de México (Cm-92).

3. De resistencia alta, 48 horas, dos *T. britovi*, ambas de carnívoros: L-93 en la Cordillera Cantabro-Astúrica, Palencia y Monegrillo (ISS 86) de un zorro de esta localidad en Los Monegros, Zaragoza.

Como contraste cierto de la solidez de estos resultados se comprobó que los aislamientos que esta vez sí eran de *T. nativa* resistieron más allá de los 10 días en que terminó el ensayo, lo que mostraron tanto la T2 tipo como la Oméxico aislada de un oso blanco del Zoo de la ciudad de México.

El trabajo, aumentado el número de ensayos, con 25 aislados de España más tres *T. nativa*, se presentó a la ICT9 celebrada en México(121) . Confirmábamos la nula resistencia de las *T. spiralis* aisladas de cerdos domésticos y jabalíes. La resistencia moderada se encontró fundamentalmente entre *T. britovi* infectando jabalíes. La mayor resistencia de dos *T. britovi* de lobo y zorro.

La resistencia a la congelación de algunos aislamientos tiene implicaciones sanitarias como demostramos en el trabajo Franchimont et al.(122) en el que infectamos cerdos con aislamientos resistentes; dos *T. spiralis* de jabalí y dos *T. britovi* de zorro y una *T. spiralis* no resistente encontrada en un jabalí en Holanda. Se observó una marcada diferencia en la localización de las larvas. En la *T. spiralis* holandesa estaban localizadas en los pilares del diafragma y lengua. En las resistentes de las dos especies, lo que es más notorio, apenas estaban presentes en el diafragma y se localizaban masivamente en la lengua; otro dato más por lo que la triquinoscopia como método de diagnóstico no es el procedimiento adecuado de prevenir una infección humana por este agente patógeno.

4.7 Otros enfoques

La presencia durante el desarrollo del discurso inaugural a la apertura del curso académico 1982-83 de la Universidad Complutense del Prof. Rafael Alvarado Ballesteros(123) y la lectura reposada posterior, junto con el estudio, entre otros, del libro *Reconstruction Phylogénétique* (124) estimularon un nuevo objetivo: indagar con los numerosos aislamientos de *Trichinella* que íbamos coleccionando y aislamientos y genotipos de otras procedencias, las relaciones entre sí de las especies y los pasos seguidos en la evolución del género.

Aunque tarde, hemos sido testigos y modestamente usuarios de la revolución de la biología producida en los 60 y años sucesivos del Siglo XX, aplicándola, casi como hobby al estudio de *Trichinella* como modelo. Es en este tiempo cuando: a) Se generaliza el uso del microscopio electrónico y consecuentemente se reinterpreta la morfología y se asocian en una unidad la morfología comparada, la genética y la ecología a la selección natural. Surge el Neodarwinismo (GG Simpson, 1961(125), E.Mayr,1969(126)) y consecuentemente se potencia la sistemática evolutiva; camino que en mi caso inicié a través de Dobzhanski (127); b) Comienza la matematización de la taxonomía: la taxonomía numérica (Sokal y Sneath, 1963(128); Sneath y Sokal, 1973(129)) y, c) Conocemos un nuevo enfoque: la sistemática clásica, filogénica de W.Hennig 1966 (130) y (77) que describe un método hipotético-deductivo, empírico de reconstrucción. Así, se generalizó la taxonomía numérica o fenética; matematización de la taxonomía con datos medibles. En evolución rapidísima, gracias al desarrollo y generalización de los ordenadores, surgieron numerosos programas para los métodos clásicos, fenéticos y probabilísticos que permiten asomarnos al pasado de la evolución a través de los árboles de acercamiento filogénico. Relatamos algunos de los sucesivos acercamientos por nuestra parte al entendimiento de la filogenia de *Trichinella*.

4.7.1 Acercamiento clásico (inicial)

Se desarrolla un acercamiento clásico, con las especies de *Trichinella* admitidas ya de modo unánime a finales de los 80 del pasado siglo XX, que empleábamos en las clases universitarias, en apoyo a la especiación que se iba conociendo. Tras definir los caracteres morfológicos y biogeográficos a comparar, lista 1 a 11 de la figura 14, se identificaban como primarios plesimórficos, derivados apomórficos o ausentes en las especies *T. pseudospiralis*, *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi* y *T. nelsoni* en comparación con *Trichuris* sp., traducido finalmente en un árbol.

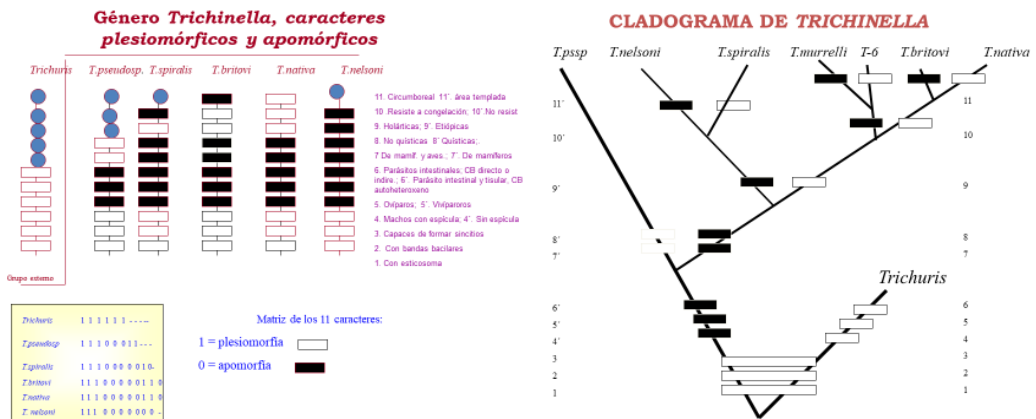


Figura 14. Ensayo cladista de relación entre sí de especies de *Trichinella*, hacia el 2000.

El resultado es el cladograma que separa las especies de *Trichinella* de *Trichuris* sp.; a continuación establece dos ramas, la que conduce a *T. pseudospiralis* y la del resto de las especies. Entre éstas, la ausencia de resistencia a la congelación, aparta a dos especies, a su vez alopátricas: en el extremo este de Eurasia una, luego universal, con los cerdos domésticos (*T. spiralis*) y en el Sudeste africano la otra (*T. nelsoni*). Las restantes se separan por el alopatrismo continental y la resistencia a la congelación o su pérdida relativa al avanzar a áreas

4.7.2 Acercamiento clásico (posterior)

1 10L 20L 0
Tspiralis Tbritovi Tnativa T6 Tmurrell Tnelsoni Tpssp Tzimbab Tpaupae
Tmuris

C1	C2	C3	C4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	V11	V12	V13	V14	V15	V16	V17	V18	V19	V20
1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0
1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0



C1. Presencia de esticosisma; C2. Machos y hembras con sólo una gónada; C3. Machos con espícula y vaina; C4. Hembras ovíparas; V5. L-1 infectantes; V6. L-1 a L-5 parasitando un sínctio de enterotícos; V7. C.B. directo; V8. C.B. autoheteroxeno; V9. L1 no encapsulada; V10. Parasitando reptiles y mamíferos; V11. Parasitando aves y mamíferos; V12. Parasitando sólo a mamíferos; V13. L1 encapsuladas, no resistentes a la congelación; V14. L1 encapsuladas y resistentes a la congelación; V15. L1 encapsuladas altamente resistentes (circumboreales); V16. L1 encapsuladas, resistentes a la putrefacción; V17. Eurasiáticas fundamentalmente; V18. Área africana (Este africano tropical; V19. Área australásica; V20. Área americana (Norteamérica)

90

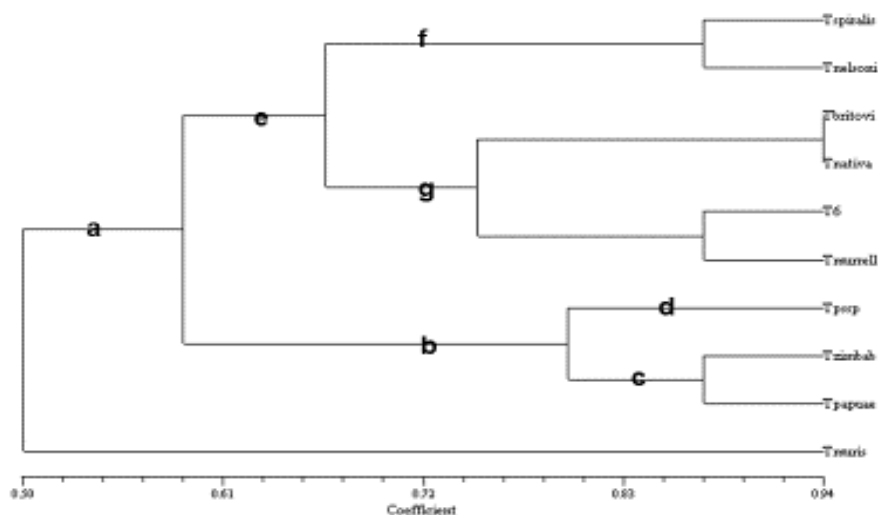


Figura 16. Arbol resultante de la matriz de la Figura 15.

Todas las especies de *Trichinella* se agrupan (a) separadas del grupo externo *T. muris*- un nematodo taxonómicamente próximo, parásito intestinal del ratón, de ciclo biológico directo. Dentro de las triquinellas se separan dos grupos: el formado por especies más antiguas, acapsuladas que parasitan a reptiles y mamíferos (c) y a aves y mamíferos (d). El otro grupo de triquinellas más modernas, capsuladas, parasitan sólo mamíferos. A su vez se separan la que no resisten la congelación (f) de las que en Eurasia la resisten en extremo o moderadamente (*T. nativa* y *T. britovi*), y de las que hacen lo mismo en Norteamérica (*T6* y *T. murrelli*). No es más que un ejemplo de cómo en grandes trazos pudo suceder la evolución de estas triquinellas capsuladas.

4.7.3 Los nuevos enfoques. Técnicas genómicas. Amplificación del ADN

Como hemos visto hasta ahora, varias técnicas de biología molecular han ido permitiendo la identificación de las especies

gemelas de *Trichinella* por pruebas de hibridación (las arriba indicadas por nosotros y otros autores como Dupoy-Camet et al. 1991(132); Zarlenga et al 1991,(133)); PCR (Wu et al., 1997) ; PCR- RFLP *restriction fragment length polymorphism* (Wu et al., 1999(134)); PCR- SSCP (*single strand conformation polymorphism* (Gasser et al., 1998(135)); así como por amplificación del ARN ribosomal (Nagano et al., 1999(136)).

4.7.3.1 PCR-RAPD

Nosotros, como así hicieron también al mismo tiempo Dupoy-Camet et al. 1994(137); Bandi et al. 1993(138) utilizamos la amplificación al azar del ADN polimórfico PCR- RAPD que a continuación indicamos. A partir de la publicación de Williams et al. 1990(139) se volvió asequible a los modestos esta técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que utiliza un solo iniciador de nucleótidos de composición arbitraria, sobre el ADN total. Se pueden detectar así polimorfismos usables como identidad, diversidad, y relación entre sí de especies. Como comunicación al ICT 8th celebrado en Orvieto (Italia) en 1994, nuestro grupo – Arribas et al(140) –presentó el potencial taxonómico de RAPD-PCR aplicado a 28 aislamientos de *Trichinella*, 19 nuevos españoles y 8 aislamientos de las especies conocidas *T. spiralis*, *T. britovi*, *T. nelsoni*, *T. nativa*, *T. pseudospiralis*, genotipos T6 y T8 más una encontrada en un cerdo infectado en México. Fue un trabajo inicial, con dos iniciadores sólo, que sin embargo proporcionó un buen resultado, porque en ambos casos separa los 16 aislados de *T. spiralis* -cinco ya conocidos por isoenzimas y seis nuevos, aislados todos de jabalíes del Noroeste peninsular, más una cepa porcina de México - . Lo mismo ocurre con las cuatro de *T. britovi* analizados – dos ya conocidos C-76 y T3 de Italia y dos nuevos de jabalí y zorro. En conjunto, como otros autores en el mismo encuentro, observamos

una estricta coincidencia en la identificación de especies con el método isoenzimático anterior.

El trabajo completo desarrollado por Arribas (61) supuso el análisis de 68 aislados: 62 españoles, más dos de Finlandia, dos de México, uno de Argentina y uno de Suiza. Los resultados fueron hartos curiosos: *T. spiralis* sólo se encontró en 6 cerdos domésticos de capa blanca más los dos americanos, así como en 7 jabalíes. La predominante fue *T. britovi* presente en 39 jabalíes y cinco zorros, uno de ellos de Suiza. Se identifican además, como *T. nativa* los dos de Finlandia más el procedente del Zoo de ciudad de México ya conocido.

La imagen de la prevalencia en esta área es sorprendente, con este 68% de predominio de *T. britovi*, lo que contrasta con los resultados presentados por Serrano et al.1994(141) con la misma técnica RAPD de aislados de jabalíes y cerdos en Extremadura con predominio de *T. spiralis* (83%). Los sistemas de explotación porcina, en régimen abierto – montanera principalmente en Extremadura-, frente a estabulación predominante en el Centro y Noroeste, además del predominio de muestras procedentes de animales salvajes, pueden ser la causa de la diferencia. En ambos hábitats se encuentran en simpatria ambas especies, una *T. spiralis* en cerdo preferentemente – sólo conocemos entre nosotros un caso denunciado de infección de un cerdo doméstico por *T. britovi*(142) causante de un brote -, la otra *T. britovi* en jabalíes y carnívoros (lobo, zorro).

El análisis estadístico de las bandas de ADN proporcionadas por cada iniciador en RAPD aclara aspectos y abre interrogantes sobre las relaciones entre sí de los polimorfismos observados en *T. spiralis*. Como mero ejemplo, se transcribe aquí el dendrograma construido con los productos de amplificación del iniciador AD1 (5'-CAAAGGGCGG) en la Figura 17 que incluye 21 aislados. Antes de discurrir por el posible significado de este análisis, conviene criticar el error que supone haber incluido en el análisis a *T.*

pseudospiralis que cuenta con personalidad propia – la ausencia de la gruesa capa de colágeno alrededor de los quistes larvarios musculares, la infección de las aves, etc. –. Considerando todos los demás aislamientos que parasitan en exclusividad a mamíferos, observamos que se separan inicialmente las dos triquinellas que no resisten la congelación: *T. spiralis* y *T. nelsoni* y dependiendo de ésta última el resto de los aislamientos. Este hecho podría interpretarse como que la presión de una glaciación inicial separó a las triquinellas que no resisten la congelación en dos áreas suficientemente alejadas como para proporcionar con el tiempo la primera separación de especies; por una parte *T. spiralis* en el extremo Sudeste eurasiático, por otra, el paso a África a través del puente del Sinaí con félidos especialmente, *T. nelsoni*. Este alopatrismo provocado y la microevolución secuencial en aislamiento geográfico originaron la primera especiación de *Trichinella* encapsuladas.

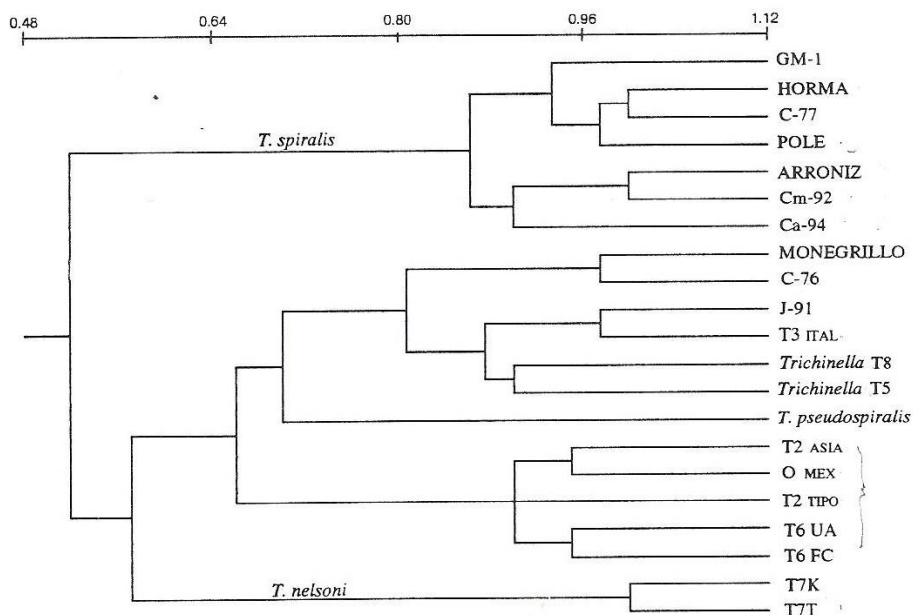


Figura 17. Dendrograma construido con los productos de amplificación del iniciador AD1 (5'-CAAAGGGCGG), método PCR-RAPD.

Antes de proseguir, la separación de las *T. spiralis* que encontramos en la península, en dos grupos diferentes puede deberse a los dos tiempos separados de llegada, posiblemente siempre con cerdos domésticos. La primera, con representantes persistiendo en la fauna salvaje ejemplarizada por ARRONIZ, un aislamiento de zorro con ICR muy bajo y que curiosamente arboriza con los aislados de cerdo en México (Cm-92) y Argentina (Ca-94); este último hecho pudiera interpretarse en paralelo con la historia general. El paso a América de *Trichinella* con los cerdos se indica por primera vez en el segundo viaje de Colón(143) – ya no eran tres carabelas, ahora son 17 naos y 1.500 hombres—y todos los animales que se necesitaba criar allá: caballos y asnos, bovinos, ovinos y caprinos, y cerdos. Para estos últimos, por ser los más difíciles de transportar al ser omnívoros y comer como los tripulantes, se recurrió a llevar hembras gestantes, unas pocas en cada barco. Con los cerdos viajó también la triquinella que aquí había antes del trabajo de los hibridistas y la producción masiva de cerdo con las razas mejoradas, necesaria para la revolución industrial.

El primer grupo de aislados de *T. spiralis* en el dendrograma, aunque también ya establecidos en la fauna salvaje local: gato montés, lobo, jabalí y el único de cerdo (POLE) cuentan con ICR alto, y posiblemente son descendientes de las últimas llegadas con las razas mejoradas europeas que se produjo a través del País Vasco(144).

Se separan bien las triquinellas resistentes a la congelación: las dos *T. nativa* usadas (T2 Asia y T2 tipo, además de la Omexico) asociadas a dos aislados del Genotipo T6 de las Rocosas, también con alta resistencia a la congelación.

Finalmente, todas las modestamente resistentes y sus derivadas alopátricas: las *T. britovi* del Sur de Europa: tres españolas y la T3 Italia. Las derivadas adaptándose a climas benignos: el

genotipo T8 del extremo Sur y Suroeste de África y *Trichinella* T5 denominada posteriormente a este análisis como *T. murrelli* de las áreas de clima templado de Norteamérica.

Proporcionan una aceptable información los coeficientes de similitud obtenidos con los ocho grupos taxonómicos (61) señalados: T1 *T. spiralis*, T3 *T. britovi*, T8 Genotipo T8, T5 *T. murrelli*, T7 *T. nelsoni*, T2 *T. nativa*, T6 Genotipo T6, T4 *T. pseudospiralis*) tras el empleo conjunto de los iniciadores AD1, Q2, F6, Z3 y 494 (Figura 18).

	T1	T3	T8	T5	T7	T2	T6	T4
T1	1.00							
T3	0.51	1.00						
T8	0.56	0.80	1.00					
T5	0.54	0.78	0.85	1.00				
T7	0.50	0.52	0.58	0.54	1.00			
T2	0.47	0.56	0.63	0.66	0.56	1.00		
T6	0.50	0.57	0.63	0.65	0.56	0.86	1.00	
T4	0.49	0.58	0.59	0.62	0.52	0.54	0.54	1.00

Figura 18. Coeficientes de similitud de ocho clados T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8 tras empleo conjunto de cinco iniciadores (PCR-RAPD).

Estos coeficientes establecen el límite de $\geq 49\%$ de diferencia entre las especies con aislamiento reproductivo: T1 $\leftrightarrow$ T2 =53%; T1 $\leftrightarrow$ T7 =50%; T1 $\leftrightarrow$ T3 = 49%. Se observan dos grupos asociados, el próximo a *T. britovi* formado por T8 con sólo un 20% de diferencia y T5 *T. mirrelli* con un 22%. A su vez, la diferencia entre T8 y T5 es sólo de un 15 %. El otro grupo que denuncian los coeficientes de similitud que proporcionan en conjunto los cinco iniciadores usados es el formado por T2 (*T. nativa*) y el Genotipo T6 de la Montañas Rocosas en Norteamérica.

En la Figura 19 se muestra el dendrograma generado por los coeficientes de similaridad obtenido de la tabla de la Figura 15.

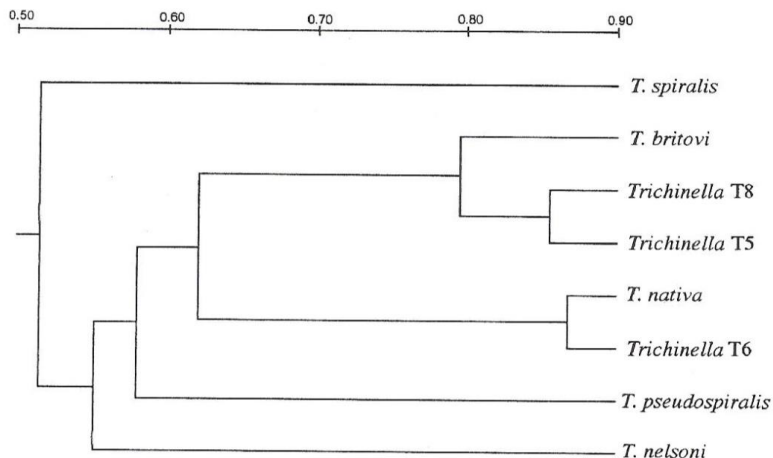


Figura 19. Dendrograma generado por los coeficientes de similaridad fruto de los iniciadores AD1, Q2, Z3 y 494 para los ocho taxones de *Trichinella* (ver texto)

Es una imagen cabal. Como en imágenes anteriores, es necesario excluir, en el análisis de las encapsuladas que parasitan mamíferos a *T. pseudospiralis*, lo que no altera la bondad de las relaciones entre sí de las especies que muestra el dendrograma.

Se observa gráficamente la separación primaria T1 (*T. spiralis*) de T7 (*T. nelsoni*) y después el grupo de la alta resistencia a la congelación (T2 *T. nativa* y Genotipo T6) y el de las moderadamente resistentes y sus derivadas a climas cálidos (T3 *T. britovi* y Genotipo T8 en África y T5 (*T. murrelli*) en Norteamérica).

Es un análisis y un resultado, visto desde la perspectiva actual, 2025, en que hago esta revisión que se adecua y adelanta a los que posteriormente se confirma. Además de la clara separación primaria de las no resistentes, divide bien separando las altamente resistentes (*T. nativa* y T6) de la “tribu” de las *T. britovi* y sus derivados hacia climas más benignos, repetido en total separación, Norteamérica y Sudáfrica.

Se sometieron también al análisis PCR-RAPD los híbridos en F1 de *T. britovi* x *T. spiralis* J2-90 y *T. britovi* x *T. spiralis* J3-90 (Martínez et al 1996(145)), así como dos aislados de zorro de la misma zona (Arroniz *T. spiralis* x Monegrillo *T. britovi*) con un 10 % de éxito en todos estos tres casos sólo en la dirección ♀ x ♂. El perfil de los patrones de amplificación fue diferente al de cada uno de los progenitores, es decir, las hibridaciones con modestos 20% ICR de 15 y 10 % ICR 8 respectivamente, existe, aunque estéril, un tráfico genético abortado entre especies simpátricas. Como ambas especies conviven entre nosotros esta circunstancia se dará en la naturaleza de nuestro entorno con frecuencia al ser T3 la predominante, infección que sí permite reinfección con *T. spiralis*.

Más raro fue el hallazgo de hibridación, en el sentido contrario con F1 modesta 20 % e ICR de 15 entre una *T. nelsoni* (T7 Kenia) y *T. spiralis* POLE ISS90 y *T. spiralis* GM-1. Aquí no hay simpatrismo y la explicación queda abierta a posteriores estudios.

Hay que tener en cuenta que los resultados de pruebas de cruzamiento entre sólo dos larvas, aunque se repitan no son más que la imagen de este muestreo. Otra cosa puede ocurrir y así parece que ocurre, no es este el momento de describirlo, cuando la infección se produce sobre una mezcla compatible(103), (146) lo que a buen seguro ocurrirá en la naturaleza y ha sido comprobado (147).

4.7.3.2 PCR-ISSR

A partir del trabajo de Zietkiewicz et al 1994(148) surge una modificación de la amplificación PCR llamada ISSR-PCR *Inter Simple Sequence Repeat*-PCR, que utiliza un único iniciador [CA]8RY con 8 repeticiones CA y un anclaje purina –pirimidina en el extremo 3'. Estas secuencias repetidas simples, conocidas también como microsatélites, son secuencias genómicas consistentes en copias

múltiples en tandem de motivos repetidos de mono, di, tri o tetranucleótidos, distintos en cada especie. Este hallazgo se convirtió en un marcador genético asequible también para el análisis de la especiación; identidad de las especies y relaciones entre sí de las mismas.

En el trabajo de tesis doctoral(77) que dirigimos a la hoy profesora chilena Flery Fonseca Salamanca, en esta parte publicado(149) se evaluó la aplicación de esta técnica a las especies de *Trichinella*. Concretamente, dos aislados de *T. britovi* españoles C76 ISS11 y Monegrillo ISS 86, uno de T8 ISS 149, dos T9 de Japón (ISS 408 y 409), uno de *T. murrelli* ISS 35, uno de *T. nativa* ISS10 y uno de T6 de la Rocosas USA ISS 34, una *T. nelsoni* ISS 29 y una *T. spiralis* GM-1 ISS48, como *T. pseudospiralis* ISS 13. En la Figura 20 se representa el dendrograma generado UPGMA a partir de la matriz de similitud genética de los perfiles electroforéticos del ADN amplificado mediante PCR-ISSR de 7 especies y cuatro genotipos de *Trichinella*.

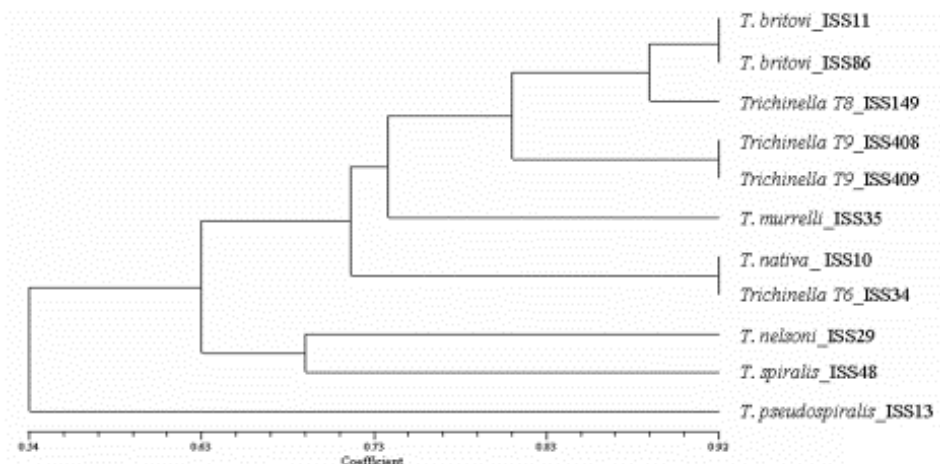


Figura 20. Dendrograma generado UPGMA a partir de la matriz de similitud genética de los perfiles electroforéticos del ADN amplificado mediante PCR-ISSR de 7 especies y cuatro genotipos de *Trichinella* spp.

Se observa la separación, sirviendo como grupo externo, entre la especie acapsulada *T. pseudospiralis* y el resto. Asimismo, entre las capsuladas, la separación neta entre las no resistentes a la congelación (*T. spiralis* y *T. nelsoni*) y las que sí, en uno u otro grado, la soportan al extenderse en áreas climáticas templadas o frías. Se agrupan, una vez más, todos los aislamientos pertenecientes a la “tribu” *T. britovi* (dos genotipos hispanos y el Genotipo T8) con alejamiento sucesivamente mayor de las T9 japonesas, diferentes entre sí, y la *T. murrelli* norteamericana. Finalmente, unidas, también en continentes que confluyen alrededor del Océano Glacial Ártico, las dos altamente resistentes a la congelación *T. nativa* y Genotipo T6.

La técnica genómica de análisis de intermicrosatélites proporciona una imagen excelente de las relaciones fenéticas de las especies de *Trichinella* (Fonseca et al. 2006 (71), (149) (150) pasó asustituir entre nosotros a la canónica hasta ahora usada (133).

Previamente, con el fin de validar la técnica y a la vez analizar la especie más abundante entre nosotros, *T. britovi*, realizamos un primer ensayo (Perteguer et al. 2009(152) con 43 nuevos aislamientos procedentes de distintos hospedadores y áreas geográficas hispanas, previamente identificados por RAPD y multiplex-PCR, así como mediante *western blot* con los monoclonales de la Universidad de Santiago US-5 y US-9 como pertenecientes a las especies *T. spiralis* (24 aislados) y *T. britovi* (43 especímenes), se sometieron al análisis por la técnica ISSR, obteniéndose los mismos resultados a nivel de identificación de especie, pero, mientras que todos las *T. spiralis* presentaban el mismo perfil que la cepa ISS116, los *T. britovi* mostraron pertenecían a dos grupos: uno, el mayoritario, responsable también de tres brotes humanos, era compatible con la cepa tipo italiana ISS2 y otro, con la clásica entre nosotros C-73(ISS11); la validación aportó al tiempo nuevos datos epidemiológicos.

En nuestro segundo trabajo, inmediatamente posterior (Fonseca et al. 2009(71)), partiendo del dato bien conocido de la coexistencia en la Península Ibérica de dos especies, se sometieron al método de identificación ISSR-PCR 105 aislados procedentes de animales salvajes, comprobándose que todos los identificados como *T. spiralis* eran idénticos a la cepa testigo de referencia entre nosotros GM-1 ISS48. Por el contrario, entre las pertenecientes a *T. britovi* se distinguían cuatro poblaciones: 1. Las idéntica a C-73 ISS 11; 2.las idénticas a MONEGRILLO ISS86 - dos genotipos ya previamente denunciados e identificados por isoenzimas y por PCR-RAPD (88); 3. Idénticas a ISS2 y, 4. Uno de nuevo perfil, procedente de un zorro en la Rioja, denominada ahora R3 o MVUL/SP/02/R3. En la imagen adjunta (figura 21) se muestra este análisis:

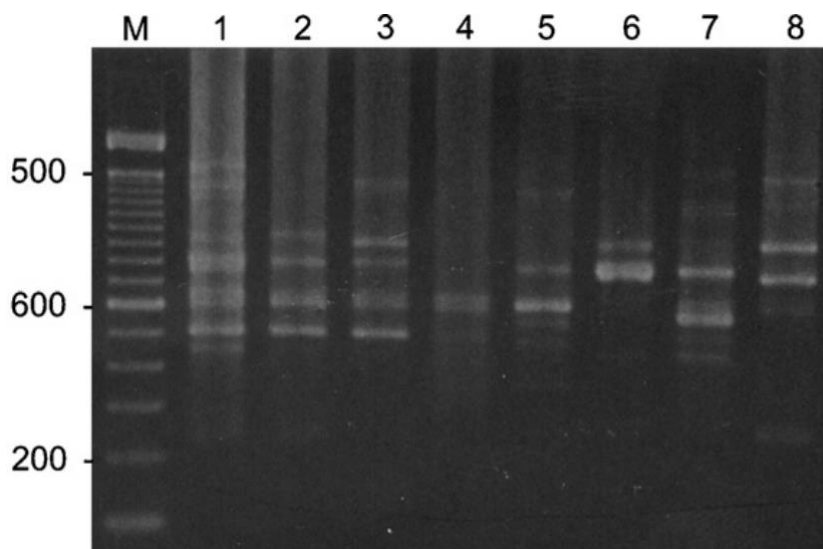


Figura 21. (Línea M) marcadores moleculares (1 kb); (L1) *T. britovi* (ISS11); (L2) *T. britovi* (ISS2); (L3) *Trichinella* Rioja 3; (L4) *T. britovi* (ISS86); (L5) *Trichinella* T8 (ISS149); (L6) *Trichinella* T9 (ISS409); (L7) *T. murrelli* (ISS35); (L8) *T. spiralis* (ISS48).

Sin género de duda, confirmamos que hay un nuevo genotipo de *T. britovi* circulando en la fauna salvaje de España. Se trata, sin

género de duda de una población diferenciada de *T. britovi* como se demuestra mediante la técnica aceptada de diferenciación PCR multiplex, figura 22.

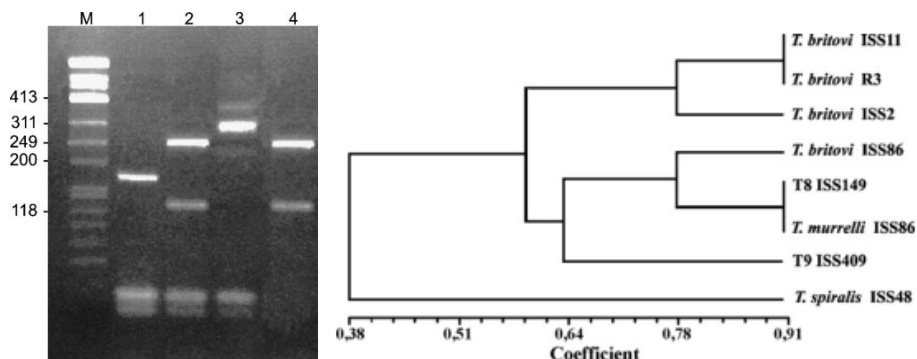


Figura 22. A la izquierda, PCR multiplex (81) línea 1. *T. spiralis*, 2. *T. britovi*, 3. *T. pseudospiralis*, 4. R3 nuevo genotipo – idéntico por esta técnica a otra *T. britovi* -. A la derecha el dendrograma UPGMA, coeficiente DICE mostrando las relaciones de similitud entre los genotipos de *T. britovi* circulando en España. Con *T. spiralis* como grupo externo, se observa mayor proximidad de R3 a nuestra C.76. Por otra parte, nuestra Monegrillo se asocia más a las dispersadas de la “tribu britovi” – valga la expresión como imagen didáctica- por otros territorios alejados: Sudoeste africano, Norteamérica y Japón.

La historia de las triquinellas en este extremo de Eurasia que en buena parte se salvó de los rigores glaciares, no está concluida. Mi vida activa sí, hace ya 17 años que me jubilé– me jubilaron, mejor– de la cátedra que desempeñé sucesivamente en las universidades de Santiago de Compostela –de feliz recuerdo– y Complutense de Madrid.

5 Bibliografía citada

1. Gould, S.E. Triquinosis (Trichinosis). Traducción de la obra *Trichinellosis in Man and Animals*. Madrid: Biblioteca de Biología Aplicada; 1952. 376 p.
2. Pozio E. and Murrell K. Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. En: *Advances in Parasitology*. Elsevier; 2006 . pp 367-439.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X06630054>
3. Grove, DIA. A history of human helminthology 1.Man. Helminthic diseases 1.22*Trichinella spiralis* and trichinellosis 571-596. C.A.B. International.
4. Chapman AD. Numbers of living species in Australia and the world. 2nd ed. Parkes, ACT: Australian Govt., Dept. of the Environment, Water, Heritage, and the Arts; 2009.
5. Aguinaldo AMA, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, et al. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature*. mayo de 1997;387(6632):489-93.
6. Giribet G. ¿Articulata o Ecdysozoa?: Una revisión crítica de la posición de los artrópodos en el reino animal. En: *Biodiversidad Mexicana. Libro digital*. México: <https://biodiversidad.gob.mx/libroDigital.pdf>;
7. Maupas, E . La mue et l'enkystement chez les nématodes. . *Arch Zool Exp Gen*. 1899;7:563-628.

8. Dorris M, De Ley P, Blaxter ML. Molecular Analysis of Nematode Diversity and the Evolution of Parasitism. *Parasitology Today* 1999;15(5):188-93.
9. Blaxter M, Koutsovoulos G. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology*. febrero de 2015;142(S1):S26-39.
10. Hodda M. Phylum Nematoda: a classification, catalogue and index of valid genera, with a census of valid species. *Zootaxa* 2022;5114(1):1-289.
11. Vicente JJ, Oliveira Rodrigues H de, Corrêa Gomes D, Magalhães Pinto R. Nematodes do Brasil. Parte IV: Nematodes de aves. *Rvta bras Zool.* 12(1):1-173.
12. Fagundes Avancini L. Helmintos e Artropodes de *Venellus chilensis* (Molina 1792) quero,quero, da região do sul do Rio Grande do Sul. Universidade Federal de Pelotas. Vol. Disertação de Pos-Graduação em Parasitologia. Pelotas: Univ.de Pelotas; 2009.
13. Thieme, H. On the infection of the liver in perch (*Acarina cernua*) with *Hepatospina acerinae* in relation to the age and sex (in German). *Wiad Parazytol.* 1961;7:856-61.
14. López-Neyra CR. Memorias de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid. Serie de Ciencias Naturales . Vol. 12. 1947. 248 pp.
15. Korhonen PK, Pozio E, La Rosa G, Chang BCH, Koehler AV, Hoberg EP, et al. Phylogenomic and biogeographic reconstruction of the *Trichinella* complex. *Nat Commun* 2016;7(1):10513.
16. Zarlenga DS, Rosenthal BM, La Rosa G, Pozio E, Hoberg EP. Post-Miocene expansion, colonization, and host switching

- drove speciation among extant nematodes of the archaic genus *Trichinella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(19):7354-9.
17. Campoamor R. Pequeños Poemas. English y Gras, editores. Madrid; 1870.
 18. Zarlenga DS, Mitreva M, Thompson P, Tyagi R, Tuo W, Hoberg EP. A tale of three kingdoms: members of the Phylum Nematoda independently acquired the detoxifying enzyme cyanase through horizontal gene transfer from plants and bacteria. *Parasitology* 2019;146(4):445-52.
 19. Zarlenga DS, Hoberg EP, Thompson P, Rosenthal B. *Trichinella*: Becoming a parasite. *Veterinary Parasitology* 2025;333:110220.
 20. Mitreva M, Jasmer DP, Zarlenga DS, Wang Zh, Abubucker S, Martin J, Taylor ChM, Yin Y, Fulton F, Minx P, Shiaw-Pyng Yang, Warren WC, Fulton RS, Bhonagiri V, Zhang X, Hallsworth-Pepin K, Clifton SW, McCarter JP, Appleton J, Mardis ER, Wilson RK. The draft genome of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Nature Genetics* 2011;43:228-35.
 21. Dupouy-Camet J, Kapel ChMO, Gołab E, Scandrett B, Zarlenga D. Early days of the International Commission on Trichinellosis (1958-1972). *Annals of Parasitology*. 2020;66(2):259-63.
 22. Marucci G, Tonanzi D, Interisano M, Vatta P, Galati F, La Rosa G. The International *Trichinella* Reference Centre database. Report on thirty-three years of activity and future perspectives. *Food and Waterborne Parasitology* 2022;27:e00156.
 23. Campbell, W C. *Trichinella* and Trichinellosis. Historical introductio pp. 1-30. New York: Plenum Press; 1983.

24. Martínez Fernández AR. *Trichinella*: resumen de historia, taxonomía, distribución y epidemiología. En: II Curso sobre Zoonosis. León: Servicio de Publicaciones, ULE (Universidad de León); 2001. p. 259-75.
25. Rojo Vazquez FA. Aspectos históricos sobre la Triquinelosis. En: Anales Rel Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid (España). Valladolid: Imprenta Sorle S.L. León; 2008. p. 1-93.
26. Virchow R. Recherches sur le développement du *Trichina spiralis*. C R Acad Sci,. 1859;49:660-2.
27. Zenker FA. Ueber die Trichinen-Krankheit des Menschen. Virchow Arch Pathol Anat,. 1860;18:561-72.
28. Zenker FA. Beiträge zur Lehre von der Trichinenkrankheit. Deutsch Arch Klin Med,. 1866;1:90-124.
29. Anonimo. First National Conference on Trichinosis. En Baltimore USA: Public Health Rep; 1953. pp. 416-20.
30. Anónimo. The second national conference on trichinosis. Am J Clin Path,. 1954;24:594-8.
31. Rausch RL, Babero BB, Rausch RV, Schiller EL. Studies on helminth fauna of Alaska. XXVII. The occurrence of larvae of *Trichinella spiralis* in Alaskan mammals. J Parasitol. 1956;42:259-71.
32. Madsen H. The distribution of *Trichinella spiralis* in sledge dogs and wild animals in Greenland under a global aspect. Medd Grøn,. 1961;159:1-124.
33. Forrester ATT, Nelson GS, Sander. The first record of an outbreak of trichinosis in Africa south of the Sahara. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1961;55:503-13.

34. Nelson GS, Guggisberg CWA, Mukundi J. Animal hosts of *Trichinella spiralis* in East Africa. *Ann Trop Med Parasitol* 1963; 57:332-346.
35. Nelson GS, Mukundy J. A strain of *Trichinella spiralis* from Kenya of low infectivity to rats and domestic pigs. *J Helminthol*. 1963;37:329-38.
36. Boev SN, Britov VA, Orlov IV. Species composition of *Trichinellae*. *Wiad Parazytol*. 1979;25:495-503.
37. Peréverzeva E. About strains of *Trichinella spiralis*. *Wiad Parazytol*. 1966;12:531-41.
38. Kozar Z, Kozar M. A Comparison of the Infectivity and Pathogenicity of *Trichinella spiralis* Strains from Poland and Kenya. *J Helminthol* 1965;39(1):19-34.
39. Cordero del Campillo M, Ramirez A, Aller B, Martínez Fernandez AR. Ensayo experimental de N-(2 cloro-nitrofenil)-5-clorosalicilamida frente a *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) adultos en el intestino del perro. *Rev Iber Parasitol* 1965;25(1-2):119-29.
40. Kruguer SP, Collins MH, vanNiekerk YW, Basson PA. Experimental observation on the South African strain of *Trichinella spiralis*. *Wiad Parazitol*. 1969;15:546-544.
41. Villella J. Morphological criteria for distinguishing the sex of *Trichinella spiralis* larvae from muscle. *JParasitol* 1966;52:908-10.
42. Britov VA, Boev SN. Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation in nature. *Vestn Akad Nauk SSSR* 1972;28:27-32.

43. Shaikenov B, Sokolova L. 1977 Identificación de *Trichinella* C-76. Carta
44. Shaikenov B, Tazieva ZCh.1977 Identificación de *Trichinella* GM-1. Carta
45. Martínez Fernandez AR, Boev SN, Sanmartín Durán ML, Bárcena F, Arias C. Presencia en España de *Trichinella nelsoni* Britov et Boev,1972. Resúmenes II Reunión anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles Madrid 27 y 28 de octubre 1978. p. 56.
46. Ayala FJ, Powell JR. Allozymes as Diagnostic Characters of Sibling Species of *Drosophila*. Proc Nat Acad Sci USA. 1972;69(5):1094-5.
47. Flockhart, HA, Harrison SE,. Dobinson AR, James ER. Enzyme polymorphism in *Trichinella*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1982;76:541-5.
48. Flockhart HA. *Trichinella* speciation. Parasitology Today 1986;2(1):1-3.
49. Flockhart HA. Isoenzyme analysis of Spanish *Trichinella* isolations. London: London School of Hygiene and Tropical Medicine, Winches Farm Field Station; 1982.
50. Pozio E. Isoenzymatic typing of 23 *Trichinella* isolates. Tropical Medicine and Parasitology. 1987;38(2):111-6.
51. Pozio E, La Rosa G, Rossi P, Murrell,KD. New taxonomic contribution to the genus *Trichinella* (Owen,1835) I, Biochemical identification of seven clusters by gen-enzyme systems. En Alicante (España): Consjo Superior de Investigaciones Científicas Press; 1988. pp. 76-82.

52. Pozio E, La Rosa G, Rossi P. *Trichinella* reference centre. *Parasit Today* 1989;5:169-70.
53. La Rosa G, Pozio E, Rossi P, Murrell . Allozyme Analysis of *Trichinella* Isolates from Various Host Species and Geographical Regions. *J Parasitol* 1992;78(4):641-6.
54. Pozio E, Rosa GL, Murrell KD, Lichtenfels JR. Taxonomic Revision of the Genus *Trichinella*. *T J Parasitol* 1992;78(4):654-9.
55. Pozio E, Rosa GL, Rossi P, Murrell KD. Biological Characterization of *Trichinella* Isolates from Various Host Species and Geographical Regions. *JParasitol* 1992;78(4):647-53.
56. Pozio E, Meneghi DD, Roelke-Parker ME, Rosa GL. *Trichinella nelsoni* in Carnivores from the Serengeti Ecosystem, Tanzania. *The Journal of Parasitology* 1997;83(6):1195-8.
57. Garate T, Albarran E, Bolas-Fernandez F, Martinez-Fernandez AR, Parkhouse RME. DNA polymorphisms within Spanish *Trichinella* isolates. *Parasitology Research*. 1991;77:602-5.
58. Arribas B, Siles M, Bolás F, Martínez Fernández AR. Randomly amplified DNA polymorphism within *Trichinella* species and isolates. Vol. ICT 8 *Trichinellosis*. Orbieto, Italia: Istituto Superiore di Sanità Press, Roma; 1994. 55-60 p.
59. Bandi C, La Rosa G, Comincini S, Tasciotti L, Damiani G, Wang G, Pozio E. Microtaxonomy of *Trichinella* spp.: Consistency of results obtained by RAPD and isozyme analyses. Vol. ICT 8 *Trichinellosis*. Orbieto, Italia: Istituto Superiore di Sanità Press, Roma; 1994. 51-66 p.

60. Zarlenga DS, Chute MB, Martin A, Kapel CM. A multiplex PCR for unequivocal differentiation of all encapsulated and non-encapsulated genotypes of *Trichinella*. *Int J Parasitol*. 1999;29:1859-67.
61. Nagano I, Wu Z, Matsuo A, Pozio E, Takahashi Y. Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology* 1999;29(7):1113-20.
62. Pozio E, Owen IL, La Rosa G, Sacchi L, Rossi P, Corona S. *Trichinella papuae* n.sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. *Int J Parasitol* 1999;29(11):1825-39.
63. Pozio E, La Ros G. *Trichinella murrelli* n. sp: etiological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *J Parasitol* 2000;86:134-9.
64. Zarlenga, DSG. La Rosa, E. Pozio, Rosenthal B. Identification and classification within the genus *Trichinella*, with special emphasis on non-encapsulated species. *Vet Parasitol* 2004;125:75-8.
65. Pozio E, Foggin CM, Marucci G, La Rosa G, Sacchi L, Corona S, et al. *Trichinella zimbabwensis* n.sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe also infecting mammals. *Int J Parasitol* 2002;32(14):1787-99.
66. Rosenthal BM, LaRosa G, Zarlenga D, Dunams D, Chunyu Y, Mingyuan L, et al. Human dispersal of *Trichinella spiralis* in domesticated pigs. *Infection, Genetics and Evolution* 2008;8(6):799-805.

67. Krivokapich SJ, Pozio E, Gatti GM, Gonzalez Prous CL, Ribicich M, Marucci G, et al. *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *Int J Parasitol* 2012;42(10):903-10.
68. Krivokapich SJ, Gatti GM, Gonzalez Prous CL, Degese MF, Arbusti PA, Ayesa GE, et al. Detection of *Trichinella britovi* in pork sausage suspected to be implicated in a human outbreak in Mendoza, Argentina. *Parasitology International* 2019;71:53-5.
69. Krivokapich SJ, Gonzalez Prous CL, Gatti GM, Saldía L. First finding of *Trichinella pseudospiralis* in the Neotropical region. *Vet Parasitol* 2015;208(3-4):268-71.
70. Sharma R, Thompson PC, Hoberg EP, Brad Scandrett W, Konecni K, Harms NJ, et al. Hiding in plain sight: discovery and phylogeography of a cryptic species of *Trichinella* (Nematoda: Trichinellidae) in wolverine (*Gulo gulo*). *Int J Parasitol* 2020;50(4):277-87.
71. Fonseca Salamanca F, Nogal Ruiz JJ, García Sánchez RN, Bolas Fernandez F, Jimenez S, Alamo R, Garate T, Martínez Fernández AR. Prevalence of *Trichinella* spp. in North Spain wild fauna and new variety of *Trichinella britovi* identification. *Vet Parasitol.* 2009;159(3-4):222-4.
72. Perteguer MJ, García Sánchez RN, Nogal-Ruiz JJ, Bolas Fernández F, Martínez Fernández AR, Gárate T. Identification of Spanish *Trichinella* isolates by ISSR-PCR: Intra-specific variability of *Trichinella britovi*. *Profesión Veterinaria*, and in *REDVET*, 6(5). 1992;15(6):70-5.
73. Martínez Fernández AR, Nogal Ruiz JJ. *Trichinella britovi* Pozio et al. 1992, la triquina endémica en los climas templados

- del Viejo Mundo. REDVET Revista electrónica veterinaria. 2005;6(5):1-12.
74. Gárate Ormaechea T. Estudio de protección cruzada entre aislamientos de *Trichinella* [Tesis Doctoral]. [Madrid]: Complutense de Madrid, UCM; 1983.
 75. Armas Serra C. Caracterización de aislamientos hispanos de *Trichinella* [Tesis Doctoral]. [Madrid]: U. Complutense de Madrid, UCM; 1997
 76. Albarrán Gómez, E. Diagnóstico serológico e identificación molecular de aislamientos hispanos de *Trichinella* [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid, UCM; 1989
 77. Fonseca Salamanca C. *Trichinella*: identificación molecular, terapéutica e inmunomodulación experimental [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid, UCM; 2005.
 78. Arribas Nobillo B. Caracterización específica de aislamientos de *Trichinella* [Tesis Doctoral]. [Madrid]: Complutense UCM; 1996.
 79. La Rosa G, Pozio E, Rossi P, Murrell KD. Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. J Parasitol 1992 Agosto 78(4):641-6.
 80. Webb KM, Rosenthal B M. Deep resequencing of *Trichinella spiralis* reveals previously un-described single nucleotide polymorphisms and intra-isolate variation within the mitochondrial genome. Infect Genet Evol. 2010;10:304-10.
 81. Piekarski G. Lehrbuch der Parasitologie unter besonderer berücksichtigung der parasiten des Menschen. Versión española: Tratado de Parasitología. Madrid: Aguilar; 1959.

82. Martínez Fernández AR. Proof of paternity also in nematodes: another unexpected traveller (Prueba de paternidad también en nematodos: otro viajero inesperado). *An Real Acad Farm*, 2018;84(4):333-4.
83. Shaikenov B, Sokolova Larisa. Identificación de C-76 (ISS11) como *T.nelsoni*. Alma Ata, Kazaghistan; Report No.: 1.
84. Martínez Fernández AR. Investigaciones sobre la eficacia de la Methiridina y de Thiabendazol frente a *Trichinella spiralis* [Tesis Doctoral]. [León Facultad de Veterinaria]: Oviedo/León; 1965.
85. Denhan DA, Martínez Fernández AR. Studies with Methyridine and "*Trichinella spiralis*" II. The use of the drug to the study the rate of larval production in mice. *Journal of Helminthology* 1970;43(3-4):357-63.
86. Martínez Fernandez AR, Cordero M, Aller B. Versuche über die Wirksamkeit von Pyranteltartrat gegen «*Trichinella spiralis*». *Berliner und Münchener Thierärztliche Wochenschrift*. 1968;81(11):223-5.
87. Arias Fernandez MC, MartínezFernández AR. Eficacia del Pamoato de Oxantel frente a «*Trichinella spiralis*». *Rev Iber Parasitol* 1983;43(2):183-91.
88. Martínez Fernández AR, Cordero M, Aller B. Ensayos sobre la eficacia del Haloxon contra "*Trichinella spiralis*". *Rev Iber Parasitol* 1967 27(3-4):173-87.
89. Martínez Fernández AR, Cordero M, Aller B. The prophylactic effect of Haloxon against experimental «*Trichinella spiralis*» infection in rats. *Ann Trop Med Parasit*, 1968;62(1):33-66.
90. Martínez Fernández AR, Rodriguez Caabeiro F, Sanmartin M. Efecto de cuatro diclorovinil fosfatos frente a las fases

- intestinales de «*Trichinella spiralis*». Rev Iber Parasitol., 1980;40(3):315-25.
91. Abia-Vega P, Bolas F, Martínez Fernández, AR. Acción antihelmíntica de Albendazol frente a «*Trichinella spiralis*». Rev Iber Parasitol. 1982;Vol-Ext.:509-18.
 92. Lopez Garcia ML, Torrado D, Torrado J, Martínez Fernández, AR., Bolás, F. Albendazole versus ricobendazole (albendazole-sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. Int J Parasitol 1997;27:781-5.
 93. López-García M L, Torrado Su, Torrado S, Martínez AR, Bolás F. Methimazole-mediated enhancement of albendazole oral bioavailability and anthelmintic effects against parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice: the influence of the dose-regime. Vet Parasitol. 1998;75(2-3):209-19.
 94. López García ML., Torrado Su, Torrado S, Martínez Fernandez, AR, Bolás, F. Improvement of albendazole efficacy against enteral, but not against parenteral stages of *Trichinella spiralis* by preparing solid dispersions in polyvinylpyrrolidone. Chemotherapy 43:430-5.
 95. Bolas F, Martínez Fernández AR. Anthelmintic effect of Oxfendazol, Febental and Tioxidazol on the variuos stages of «*Trichinella*». ICT 5th Trichinellosis. Noordwijk aan Zee, The Netherlands: Reedbooks Ltd; 1981. p. 331-5.
 96. Sanmartin M, Bolas F, Martínez Fernández AR. Acción de Oxfendazol sobre larvas enquistadas de «*Trichinella spiralis*».I.Evolución histopatológica. Rev Iber Parasitol 1982;Vol. Ext.:519-32.
 97. Rodríguez Caabeiro F, Martínez Fernández AR, Sanmartin M. Acción antihelmíntica de bencimidazol carbamatos frente a

- «*Trichinella spiralis*». III. Oxibendazol. Rev Iber Parasitol 1978;38(3-4):623-38.
98. Cordero M, Martínez Fernández AR, Aller B. Some facts concerning the epizootiology of Trichinellosis in Spain. Wiad Parazyt 1970;16(1):100-8.
 99. La Rosa G, Pozio E, Rossi P, Murrell K D. Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. J Parasitol 1992;78(4):641-6.
 100. Martínez Fernández AR, Sanmartín Durán ML. Some differences in the biological behavior of various sibling species of *Trichinella*. En: ICT5 Trhichinellosis. Reedbooks Ltd; 1981. pp. 35-9.
 101. Sanmartín Durán ML. Inmunidad mediada por células en el ciclo endógeno de *Trichinella spiralis* [Tesis Doctoral]. Santiago de Compostela; 1979.
 102. Martínez Fernández AR, Sanmartin Duran ML, Ortega MG, Garate T. Cross immunity levels among sibling species of *Trichinella*. En ICT Trichinellosis 5th, Noordwijk aan Zee, The Netherlands: Reedbooks Ltd; 1980. p. 129-33.
 103. Rodríguez E, Olmedo J, Ubeira FM, Blanco C, Gárate T. Mixed infection, *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi*, in a wild boar hunted in the Province of Cáceres (Spain). Exp Parasitol. julio de 2008;119(3):430-2.
 104. Von Bernhard Rensch. Das Prinzip geographischer Rassenkreise und das Problem der Artbildung. Berlin: Gebrüder Borntraeger; 1929. pp. 206.
 105. Calero R, Martínez F, Hernández S, Acosta, I . Parasitación de *Buteo buteo* (Aves:Accipitridae) por *Trichinella* sp. en el

- Parque Zoológico de Jerez de la Frontera. Rev Iber Parasitol. 1978;38(1-2):135-8.
106. Calero R, Becerra C, Martínez F, Hernández S. Epidemiología de la Triquinosis en la Provincia de Córdoba. Rev Iber Parasitol. 1978;38(1-2):239-48.
 107. Pozio E, Goffredo R, La Rosa G. *Trichinella pseudospiralis* in Sedentary Night-Birds of Prey from Central Italy. J Parasitol. 1999;85(4):759.
 108. Zamora MJ, Alvarez M, Olmedo J, et al. *Trichinella pseudospiralis* in the Iberian peninsula. Vet Parasitol. 2015;210(3-4):255-9.
 109. Martínez Fernandez AR, Sanmatin Duran ML. Some differences in the biological behavior of various sibling species of *Trichinella*. En: ICT5 Trichinellosis. Noordwijk aan Zee, The Netherlands: Reedbooks Ltd; 1980. p. 35-9.
 110. Garate T, Rivas L. Comparative study on polypeptide patterns of larvae of *Trichinella* isolates by two-dimensional electrophoresis. J Helminthol 1987;61(3):225-8.
 111. Rodríguez-Caabeiro F, Criado-Fornelio A, Jiménez-González A. A comparative study of the succinate dehydrogenase-fumarate reductase complex in the genus *Trichinella*. Parasitology 1985;91:577-83.
 112. Jiménez-González A, Rodríguez-Caabeiro F, Calvo-Guerrero A, Casado Escribano N. A comparative study of malate-dehydrogenase in the genus *Trichinella*. En ICT 7 Tricinellosis. Alicante (España): CSIC Press; 1988. p. 53-8.
 113. Gómez-García V, Rodríguez Pérez J, Rodríguez Osorio M, Rojas González J, Gómez-Morales MA. Diferenciación entre aislamientos de *Trichinella* mediante anticuerpos

- monoclonales. Poster p.352 presentado en: VI Congreso Nacional y Primer Congreso Ibérico de Parasitología; 1989; Cáceres.
114. Arribas Novillo MB. Caracterización específica de aislamientos de *Trichinella* [Tesis Doctoral]. [Madrid]: Complutense, Madrid; 1996.
 115. Ooi HK, Oku Y, Kamiya M, Ohbayashi M. Interbreeding and fecundity of a single pair of two strains of *Trichinella spiralis* in mice. *Jpn J Vet Res* . 1984;32(4):177-82.
 116. Cordero del Campillo M, Rojo Vazquez FA, Martínez Fernández AR. et al. Parasitología Veterinaria. 1ª Edición Madrid: McGRAW-HILL. Interamericana; 1999. 968 p.
 117. Martínez Fernández, A R. Prueba de paternidad también en nematodos: otro viajero inesperado. *Anales R A Nacional de Farmacia*. 2018;84(4):333-4.
 118. Orlov IV, Britov VA, Boev SN. El uso de la técnica de entrecruzamiento en el diagnóstico de helmintos con varios hospedadores (En ruso). *Vestn S-kh Nauki* (Moscú). 1976;12:61-6.
 119. Marucci G, La Grange LJ, La Rosa G, Pozio E. *Trichinella nelsoni* and *Trichinella T8* mixed infection in a lion (*Panthera leo*) of the Kruger National Park (South Africa). *Veterinary Parasitology* 2009;159(3-4):225-8.
 120. Dea Ayuela MA. Caracterización inmunobiológica de las especies de *Trichinella* [Tesis Doctoral]. [Madrid]: Complutense, Facultad de Farmacia; 1999.
 121. Martínez Fernandez AR, Arribas MB, Bolas F. Freezing resistance of Spanish *Trichinella* isolates (*T.spiralis* and

- T.britovi). En ICT9 Trichinellosis, México City; 1996. p. 99-105.
122. Franchimont JH, Knapen F van, Martínez Fernández AR. Biological diversity of Trichinellaisolates in experimental infected pigs. En ICT 9 Trichinellosis Mexico City; 1996. p. 37-41.
 123. Alvarado Ballester R. La Sistemática: Biología de ayer, de hoy y de mañana. Discurso de apertura del curso 1982-83 UCM. Madrid: Editorial de la Universidad Complutense; 1982. 1-52 p.
 124. Darlu P, Tassy P. Reconstruction Phylogénétique. Concepts et méthodes. Collection Biologie théorique 7. Paris: Masson; 1993. 1-245 p.
 125. Simpson GG. Principles of Animal Taxonomy. USA: Columbia University Press; 1961. (Columbia Biological Series).247 p.
 126. Mayr E. Principles of Systematic Zoology. McGraw Hill, New York; 1969. 416 p.
 127. Dobzhansky T. Genética y el origen de las especies. Círculo de Lectores. Madrid; 1997.487 pp.
 128. Sokal RR, Sneath HA. Principles of Numerical Taxonomy. **W.H.Freeman & Co Ltd; 1963. (Books in Biology S).338 pp.**
 129. Sneath HA, Sokal RR. Numerical taxonomy; the principles and practice of numerical classification. San Francisco, USA: Freeman; 1973. 547 pp.
 130. Hennig W. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press; 1966.

131. Hennig W. Elementos de una sistemática filogenética. Editoria universitaria de Buenos Aires; 2020. 224 pp. (CienciaNaturales. Biología. Colección manuales).
132. Soule C, Guillou J, Rouer P, Lavareda de Souza S, Ancelle T, Benarous R. Detection of repetitive sequences of *Trichinella spiralis* by the polymerase chain reaction in experimentally infected mice. *Parasitology Research* 1991;77:180-2.
133. Zarlenga DS, al-yaman F, minchella DJ, La Rosa G. A repetitive DNA probe specific for a North American sylvatic genotype of *Trichinella*. . *Molecular and Biochemical Parasitology*. 48:131-7.
134. Wu Z, Nagano I, Pozio E, Takahashi Y. Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for the identification of *Trichinella* isolates. *Parasitology*. 1999;118:211-8.
135. Gasser RB, Zhu XQ, Monti RJ, Dou I, Cai X, Pozio E. PCR-SSCP of rDNA for the identification of *Trichinella* isolates from mainland China. *Molecular and Cellular Probes*. 12:27-34.
136. Nagano I, Wu Z, Matsuo A, Pozio E, Takahashi Y. Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction– restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. *Int J Parasitol*. 1999;29:1113-20.
137. Dupouy-Camet J, Robert F, Guillou JP, Vallet C, Perret C, Soule C. Identification of *Trichinella* isolates with random amplified polymorphic DNA markers. *Parasitology Research*. 1994;80:358-60.

138. Bandi C, La Rosa G, Comincini S, Damiani G, Pozio E. Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology* 107: 419–424. 107:419-24.
139. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingry SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990;(18):7213-8.
140. Arribas B, Siles F, Bolas F, Martínez Fernández AR. Randomly amplified DNA polymorphism within *Trichinella* species and isolates. En Orvieto (Italia): ISS Press; 1996. p. 55-60.
141. Serrano F, Bandi C, La Rosa G, Pérez Martín JC, Reina D, Tascioti L, Pozio E. Relationships between habitat and *Trichinella* species. En *Trichinellosis 8th Orvieto (Italy)*: ISS Press Roma; 1994. p. 549-54.
142. Rodríguez E, Rodríguez M, Nieto J, Gárate T. Identificación de *Trichinella britovi* (T3) como agente causal de un brote humano de triquinosis. En *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*. Sitges, Barcelona; 1994. p. 30.
143. Fernández de Navarete, M. Relaciones, cartas y otros documentos concernientes a los 4 viajes que hizo el almirante D. Cristóbal Colón: para el descubrimiento de las Indias Occidentales. Editorial Maxtor, Valladolid; 2005.
144. Mendizabal Aizpura JA, Etxaniz Makagaza JM. Primeras acciones para la modernización de la agricultura Guipuzcuana III. La Casa modelo de agricultura de Yarramendi (1856-1867). En *XV Congreso Nacional y VI Congreso Iberoamericano de Historia de la Veuerinaria*, Córdoba, España; 2009. p. 295-8.
145. Martínez Fernández AR, Arribas MB, Dea Ayuela MA, Bolas F. Identity of *Trichinella britovi*: compatibility and

- reproductive isolation. En ICT9Trichinellosis, México City; 1996.
146. Pérez-Martín JE, Serrano FJ, Reina D, Mora JA, Navarrete I. Sylvatic trichinellosis in southwestern Spain. *J Wildl Dis* 2000;36(3):531-4.
 147. La Rosa G, Calero-Bernal R, Pérez-Martín JE, Tonanzi D, Galati F, Serrano-Aguilera FJ, et al. Rare but evolutionarily consequential outcrossing in a highly inbred zoonotic parasite. *Int J Parasitol* 2018;48(7):543-53.
 148. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genomic fingerprinting by sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction. *Genomics*. 1994;20:173-83.
 149. Fonseca-Salamanca F, Nogal-Ruiz JJ, Benito C, Camachot MV, Martínez Fernández AR. Molecular characterization of *Trichinella* genotypes by inter-simple sequence repeat polymerase chain reaction (ISSR-PCR). *J Parasitol*. 2006;93(3):606-10.
 150. García-Sánchez RN, Nogal-Ruiz JJ, Manzano-Lorenzo R, Díaz JMA, López GP, Ruano FJS, et al. Trichinellosis survey in the wild boar from the Toledo mountains in south-western Spain (2007-2008): molecular characterization of *Trichinella* isolates by ISSR-PCR. *J Helminthol* 2009;83(2):117-20.
 151. Perteguer MJ, Rodríguez E, García-Sánchez RN, Nogal-Ruiz JJ, Bolas-Fernández F, Martínez-Fernández AR, et al. Identification of Spanish *Trichinella* isolates by ISSR-PCR: intra-specific variability of *Trichinella britovi*. *Vet Parasitol* 2009;159(3-4):206-9.

