

## RESOLUCION RZ 193/96

Buenos Aires, 8 de abril de 1996

### VISTO:

El Expediente n° 118.543/95 en cual obra la Resolución n° 1.629 del 30 de diciembre de 1994, que establece la modificación de los numerales del Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de Origen Animal, aprobado por Decreto n° 4.238/68 del 19 de julio de 1968, relacionados con la investigación del parásito *Trichinella spiralis* en carnes para consumo, y

### CONSIDERANDO:

Que en la nueva redacción del numeral 11.5.56 se expresa que dicha investigación se realizará por métodos aprobados por el SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.

Que en concordancia con lo expresado en los considerandos del referido Acto Legal por la Comisión Permanente de Estudios y Actualización del mencionado Reglamento, la GERENCIA DE LABORATORIOS por intermedio de la Coordinación General de Zootécnicos, produce informe en el que expresa que la investigación en cuestión ejecutada a través de la Técnica Diagnóstica de Digestión Artificial permitirá incrementar el grado de aptitud sanitaria de las carnes porcinas para consumo, debido a la mayor sensibilidad que presenta, en comparación con la Técnica de Triquinoscopia Directa, debido a que esta última no permite la detección del parásito en reses infestadas bajo la forma «subclínica», es decir con menos de 3 larvas por gramo de músculo, lo cual implica un serio riesgo para la salud del consumidor, dado que dicha carga parasitaria posibilitaría la manifestación clínica de la enfermedad.

Que la Unión Europea para la investigación del parásito en cuestión, en la importación procedente de terceros países de carnes frescas de animales domésticos de la especie porcina ha adoptado la mencionada técnica a través de la Directiva 77/96/C.E.E., modificada por sus similares 83/91/C.E.E. y 84/319/C.E.E.

Que en la Directiva 84/319/C.E.E., conforme a los avances realizados, se adoptan diversos métodos de dicha técnica, a fin de permitir la ejecución de la opción correspondiente, los cuales ofrecen suficientes garantías sanitarias; asimismo, cabe mencionar que en los métodos en cuestión se recomienda analizar muestras musculares de un peso de 1 gramo.

Que la preocupante situación epidemiológica de esta Zoonosis en nuestro país, dada por la frecuencia de focos en porcinos, la diversidad de niveles de infestación y la gravedad de brotes en personas en un amplio territorio del país, condiciona a extremar la certeza de su diagnóstico.

Que luego de diagnósticos negativos en muestras de 1 gramo, se ha comprobado la infestación al analizar muestras de mayor peso, por lo que acorde con la situación epidemiológica de esta Zoonosis en nuestro país, se debería incrementar el peso de la muestra llevándolo a 2 gramos, a fin de posibilitar una mayor confiabilidad de los diagnósticos y por ende, en la aptitud sanitaria para el consumo de las reses.

Que asimismo, en el caso de porcinos procedentes de un foco de Trichinelosis (remanentes), ante la mayor probabilidad de la infestación, se deberían analizar muestras de un peso mínimo de 10 gramos, a fin de alcanzar un mayor grado de confiabilidad en los diagnósticos.

Que, en consecuencia, correspondería establecer la investigación del parásito *Trichinella spiralis* mediante la Técnica de Digestión Artificial, ejecutada acorde con los métodos señalados en la mencionada Directiva, aunque tomando para analizar muestras de un peso de 2 gramos para porcinos de faena de rutina y de 10 gramos para porcinos procedentes de focos de trichinelosis.

Que la SUBGERENCIA DE ASUNTOS JURIDICOS emitió opinión legal al respecto.

Que el suscripto es competente para entender en esta instancia de conformidad con lo establecido por el Artículo 33, Anexo 1 del Decreto N° 1553 del 12 de agosto de 1991, reglamentario de la Ley N° 23.899.

Por ello,

EL ADMINISTRADOR GENERAL DEL SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL

**RESUELVE:**

ARTICULO 1°.- Establecer la Técnica Diagnóstica de Digestión Artificial para la investigación del parásito *Trichinella spiralis* en las carnes porcinas para consumo, la que se realizará tomando muestras musculares de un peso de 2 gramos para porcinos de faena de rutina y de 10 gramos para porcinos procedentes de focos de trichinelosis, conforme a la descripción de los métodos que se consignan en el Anexo 1, que forma parte integrante de la presente Resolución, con las correcciones proporcionales que deban realizarse, según corresponda.

ARTICULO 2°.- Cualquier modificación a la técnica o a los métodos indicados en el artículo anterior, deberá ser aprobada por la GERENCIA DE LABORATORIOS del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL.

ARTICULO 3°.- Comuníquese, publíquese, dése a la Dirección Nacional del Registro y Boletín Oficial y archívese.

RESOLUCION N° 193/96

## ANEXO I

Técnica de Digestión Artificial para el Diagnóstico de Trichinelosis - Métodos:

### 1.- Método de la Digestión Artificial de Muestras

Colectivas:

#### a) Instrumental y Reactivos

- Un cuchillo y pinzas para la toma de muestras.
- Una máquina de picar carne cuyos agujeros deberán tener un diámetro comprendido entre 2 y 3 mm.
- Un matraz Erlenmeyer de 3 l, provisto de un tapón de goma o de guata.
- Un embudo cónico de separación de una capacidad de 2.000 ml.
- Un soporte normal con el pie en forma de A, de 28 cm de longitud, provisto de una varilla de 80 cm
- Un anillo de 10 a 11 cm que pueda fijarse al soporte.
- Una pinza provista de una boca chata (23/40 mm) que pueda sujetarse al soporte mediante un manguito doble.
- Un tamiz (finura de malla 177 micrones) de un diámetro exterior de 11 cm, provisto de una rejilla de latón o de acero inoxidable.
- Un embudo de un diámetro inferior mínimo de 12 cm
- Probetas graduadas de 100 ml
- Un estereomicroscopio (aumento de 15 a 40 veces), que disponga de una iluminación adecuada o de un triquinoscopio provisto de una tabla horizontal para el compresor, que disponga de una iluminación adecuada.
- En caso de utilización de un triquinoscopio: una cubeta para el cómputo de larvas, que se podrá describir de la siguiente manera:

Una cubeta formada por placas acrílicas de un espesor de 3 mm. y que reúna las siguientes características:

- i) fondo de la cubeta: 180 por 40 mm, dividido en cuadrados.
- ii) placas laterales: 230 por 20 mm.
- iii) placas frontales: 40 por 20 mm.

El fondo y las placas frontales deberán estar fijos entre las placas laterales de manera que formen una cubeta provista de 2 pequeñas asas en los dos extremos.

La parte superior del fondo deberá estar entre 7 y 9 mm más elevada con relación a la base del cuadrado formado por las placas laterales y frontales. Las placas deberán fijarse mediante una cola adecuada al material.

En caso de utilización del estereomicroscopio, una serie de placas de Petri, de un diámetro de 9 cm, cuyo fondo esté dividido en cuadrados de examen de 10 por 10 mm, mediante un instrumento puntiagudo.

- Varios cubos de 10 litros que se utilizarán en el momento de la descontaminación de los instrumentos mediante un tratamiento como el formol y para el jugo digestivo que quede en caso de resultado positivo.

- Acido Clorhídrico concentrado (37%).

- Concentración de Pepsina: 1:10.000 N.F. (U.S. National Formulary); correspondiente a 1:12.500 B.P. (British Pharmacopea); correspondiente a 2.000 F.I.P. (Federación Internacional de Farmacia).

- Un número de bandejas que puedan contener 50 muestras de aproximadamente 4 g cada una.

- Una balanza de precisión de 0,1 g.

b) Toma de muestras:

1 - Cuando las canales estan enteras, tomar una muestra, de aproximadamente 4 g, en uno de los pilares del diafragma, en la zona de transición entre la parte muscular y la parte tendinosa; si no hubiere pilar del diafragma, tomar la misma cantidad en la parte del diafragma situada cerca de las costillas o del esternón o en la musculatura de la lengua o en los músculos masticadores o también en la musculatura abdominal.

2 - Para los trozos de carne, tomar una muestra de aproximadamente 4 g en los músculos esqueléticos que contengan poca grasa y en la medida que sea posible, cerca de los huesos o de los tendones.

c) Método:

1- Procedimiento de Digestión:

i) Grupos completos de muestras (50 a la vez): Se tomará una muestra de aproximadamente 2 g, de cada una de las 50 muestras individuales procedentes de los cerdos. La muestra colectiva se pasará una vez por la máquina de picar carne. La carne picada se colocará en el matraz Erlenmeyer de 3 l. al mismo tiempo que 7 g de pepsina y se cubrirá con 2 l. de agua de grifo calentada a una temperatura aproximada de 40 a 41°C y con 25 ml de ácido clorhídrico concentrado. Agitar la mezcla para disolver la pepsina.

El pH de la solución será, entonces, de aproximadamente 1,5 a 2.

- Para la digestión, el matraz Erlenmeyer se colocará en una estufa a 40 – 41°C durante 4 horas aproximadamente.

Durante ese tiempo, se agitará regularmente como mínimo, dos veces por hora.

- Digerida la solución, se filtrará, mediante un tamiz, a través del embudo cónico de separación de 2 l. y se

dejará en reposo sobre el soporte durante, por lo menos, una hora.

- Se trasegará a una probeta graduada, un volumen total de aproximadamente 45 ml y se distribuirá en tres placas de Petri, cuyos fondos estarán divididos en cuadrados de 15 ml por placa.

- Cada placa de Petri se examinará minuciosamente en el estereomicroscopio, con el fin de descubrir las larvas.

- En caso de utilización de cubetas para el cómputo de larvas, los 45 ml se distribuirán en dos cubetas y se examinarán en el triquinoscopio.

Las larvas aparecerán en el sedimento como unos organismos identificables y si el agua estuviera tibia, frecuentemente se podrán observar los enrollados y desenrollados de la espiral.

- Los líquidos de digestión se deberán examinar desde el momento en que estén dispuestos. En ningún caso se podrá postergar el examen para el día siguiente.

Si los líquidos de digestión no fueran lo suficientemente transparentes o si no se examinarán en el plazo de 30 minutos siguientes a su preparación, se deberán clarificar de la siguiente manera: verter la muestra final, de aproximadamente 45 ml en una probeta graduada y dejar sedimentar durante 10 minutos.

Después de dicho tiempo, quitar por aspiración, 30 ml del líquido sobrenadante y agregar agua de grifo a los 15 ml restantes hasta obtener un volumen total de 45 ml. Después de un nuevo periodo de reposo de 10 minutos, quitar por aspiración 30 ml del líquido sobrenadante, verter los 15 ml restantes en una placa de Petri o en una cubeta para cómputo de las larvas, con vistas a su examen. Lavar la probeta graduada con 10 ml de agua de grifo, agregar el líquido obtenido a la muestra en la placa de Petri o en la cubeta de cómputo de larvas y examinar.

ii) Grupos de menos de 50 muestras:

Se podrá agregar un máximo de 7 muestras individuales a un grupo completo de 50 muestras para examinarlas al mismo tiempo que estas últimas. Si el número de muestras que se deban examinar es superior a 7 e inferior a 50, el líquido de digestión se deberá reducir proporcionalmente.

2. - En caso de resultado positivo o dudoso del examen de una muestra colectiva, se deberá tomar una muestra de 20 g de cada cerdo, de acuerdo con las indicaciones contempladas en la anterior letra b). Las muestras de 20 g procedentes de 5 cerdos se deberán reunir y examinar de acuerdo con el método arriba descripto. De esta forma se examinarán las muestras de 10 grupos de 5 cerdos. Si se descubrieran las triquinias en un grupo de muestras de 5 cerdos, se deberán tomar las muestras de 20 g de cada animal que pertenezca a dicho grupo y se deberán examinar de acuerdo con el método arriba descripto.

2.- Método de la Digestión de Muestras Colectivas con utilización de un Agitador Magnético:

a) Instrumental y reactivos:

- Un cuchillo y pinzas para la toma de muestras.
- Bandejas divididas en 50 cuadrados que puedan contener, cada uno, muestras de carne de 4 g, aproximadamente.
- Un molinillo.
- Un agitador magnético provisto de una placa térmica de temperatura controlada y una barra magnética (recubierta de teflón) de 5 cm aproximadamente.
- Embudos de separación cónicos de una capacidad de 2 litros.
- Soportes con anillos y fijaciones.
- Tamices, finura de la malla 177 micrones, de un diámetro exterior de 11 cm, provistos de una rejilla de acero inoxidable.
- Embudos de un diámetro interior mínimo de 12 cm, destinados a recibir el tamiz.
- Un vaso de precipitado de 3 litros.

- Probetas graduadas de una capacidad aproximada de 50 ml, o tubos de centrifugación.
- Un triquinoscopio provisto de una tabla horizontal o un estereomicroscopio que disponga de una iluminación adecuada.
- Una cubeta para el cómputo de larvas (en caso de utilización de un triquinoscopio).

La cubeta deberá estar formada por placas acrílicas de un espesor de 3 mm y deberá presentar las siguientes características:

- i) fondo de la cubeta: 180 por 40 mm, dividido en cuadrados.
- ii) placas laterales: 230 por 20 mm.
- iii) placas frontales: 40 por 20 mm.

El fondo y las placas frontales deberán estar fijos entre las placas laterales de manera que formen dos pequeñas asas en los dos extremos. La parte superior del fondo deberá estar entre 7 y 9 mm más elevada con relación a la base del cuadrado formado por las placas laterales y frontales. Fijar las placas con una cola adecuada al material.

- Varias placas de Petri, en caso de utilización de un estereomicroscopio, cuyo fondo se ha dividido en cuadrados de 10 por 10 mm., mediante un instrumento puntiagudo.

- Una hoja de aluminio.

- Acido Clorhídrico de 25%.

- Concentración de Pepsina: 1:10.000 N.F. (U.S. National Formulary); correspondiente a 1:12.500 B.P. (British Pharmacopea); correspondiente a 2.000 FIP (Federación Internacional de Farmacia). Agua de grifo calentada a una temperatura de 46°C – 48°C.

Varios cubos de 10 litros que se utilizarán en el momento de la descontaminación del instrumental, mediante un tratamiento como el formol y para el jugo digestivo que quede en caso de resultado positivo.

- Una balanza de precisión de 0,1 g.

b) Toma de muestras:

1.- Cuando las canales estan enteras, tomar una muestra, de aproximadamente 4 gr., en uno de los pilares del diafragma, en la zona de transición entre la parte muscular y la parte tendinosa, si no hubiere pilar del diafragma, tomar la misma cantidad en la parte del diafragma situada cerca de las costillas o del esternón o en la musculatura de la lengua o en los músculos masticadores o también en la musculatura abdominal.

2.- Para los trozos de carne, tomar una muestra de aproximadamente 4 g. en los músculos esqueléticos que contengan poca grasa y en la medida que sea posible, cerca de los huesos o de los tendones.

c) Método:

1 – Procedimiento de Digestión

i) Grupos completos de muestras (50 a la vez):

- Triturar en el molinillo 50 muestras de aproximadamente 2 g, tomadas de cada muestra individual de acuerdo con las indicaciones de la letra b). Hacer funcionar el aparato tres o cuatro veces durante un segundo.

- Llevar la carne picada a un vaso de precipitado de 3 litros y espolvorearla con 10 g de pepsina. Introducir en el vaso de precipitado 2 litros de agua de grifo calentada a una temperatura de 46 °C – 48° C y agregar 16 ml de ácido clorhídrico.

- Introducir varias veces el dispositivo de triturado del molinillo en el líquido de digestión que se encuentre en el vaso de precipitado para quitar de él las sustancias que aún tenga adheridas.

- Colocar la barra magnética en el vaso de precipitado y cubrirlo con una hoja de aluminio.

- Colocar el vaso de precipitado en la placa precalentada del agitador magnético y comenzar la agitación.

Antes de empezar el proceso de agitación, se deberá regular el agitador magnético de tal forma que durante el funcionamiento pueda mantenerse una temperatura constante de 44° C – 47° C. Durante el proceso de agitación, el líquido de digestión deberá girar a una velocidad lo suficientemente elevada que permita la formación de un profundo remolino central sin provocar salpicaduras.

- Agitar el líquido de digestión durante 30 minutos, parar el aparato; filtrar el líquido de digestión a través de un tamiz colocado en un embudo y recoger el filtrado en un embudo de separación.

- Dejar el líquido de digestión en el embudo de separación durante 30 minutos.

- Después de 30 minutos, traspasar rápidamente una muestra de 40 ml del líquido de digestión a la probeta graduada o al tubo de centrifugación.

- Dejar reposar la muestra de 40 ml durante 10 minutos y luego aspirar 30 ml de líquido sobrenadante dejando así un volumen de 10 ml.

- La muestra de 10 ml del sedimento restante se verterá en una cubeta para el cómputo de larvas o en una placa de Petri.

- Enjuagar la probeta graduada o el tubo de centrifugación con aproximadamente 10 ml de agua de grifo que se agregará a la muestra de la cubeta de cómputo de larvas o a la placa de Petri. Luego proceder a la observación en el triquinoscopio o al examen en el estereomicroscopio, según el caso.

- Los líquidos de digestión deberán observarse desde el momento en que estén dispuestos.

En ningún caso se podrá postergar el examen para el día siguiente. Si los líquidos de digestión no se examinan en el plazo de 30 minutos siguientes a su preparación, se deberán clarificar de la siguiente manera:

verter la muestra final, de aproximadamente 40 ml. en una probeta graduada y dejar sedimentar durante 10 minutos. Después de dicho tiempo, quitar 30 ml del líquido sobrenadante con el fin de obtener un volumen de 10 ml.

Dicho volumen se llevará a 40 ml. con agua de grifo.

Después de un nuevo período de reposo de 10 minutos, quitar por aspiración 30 ml. del líquido sobrenadante para obtener un volumen de 10 ml que se examinará en una placa de Petri o en una cubeta para cómputo de larvas. Lavar la probeta graduada con 10 ml de agua de grifo y agregar el líquido obtenido a la muestra en la placa de Petri o en la cubeta de cómputo de larvas, para su examen. Si el examen revela que el sedimento no está claro, se deberá verter la muestra en una probeta graduada y con agua de grifo de deberá llevar su volumen a 40 ml. Luego se aplicará el método arriba mencionado.

ii) Grupos de menos de 50 muestras:

Eventualmente, se podrán agregar 7 muestras de 2 g cada una a un grupo de 50 muestras y se podrán examinar al mismo tiempo que estas últimas, de acuerdo con el método descrito en la letra c). Se deberán examinar más de 8 muestras en calidad de grupo completo. En el caso de grupos que lleguen hasta las 25 muestras, los líquidos de digestión se podrán reducir a 1.000 ml.

2 - En caso de resultado positivo o dudoso del examen de una muestra colectiva, se deberá tomar una muestra de 20 g de cada cerdo, de acuerdo con las indicaciones contempladas en la anterior letra b). Las muestras de 20 g procedentes de 5 cerdos se deberán reunir y examinar de acuerdo con el método arriba descrito. De esta forma se examinarán las muestras de 10 grupos de 5 cerdos. Si se detectan las triquinias en un grupo de muestras de 5 cerdos, se deberán tomar las muestras de 20 g de cada animal que pertenezca a dicho grupo y se deberán examinar de acuerdo con el método arriba descrito.

3 - Método de la Digestión de Muestras Colectivas con Asistencia Mecánico/Técnica de la Sedimentación:

a) Instrumental y reactivos:

- Un cuchillo o tijeras para cortar las muestras.
- Bandejas divididas en 50 cuadrados que puedan contener, cada uno, muestras de carne de aproximadamente de 4 g.
- Un Stomacher Lab-blender 3.500, Thermo model.
- Bolsas de plástico adaptadas al Stomacher Labblender.
- Embudos de separación cónicos de una capacidad de 2 litros, preferentemente provistos de llaves de seguridad de Teflon.
- Soportes con anillos y fijaciones.
- Tamices, finura de malla 177 micrones, de un diámetro exterior de 11 cm, provistos de una rejilla de acero inoxidable.
- Embudos de un diámetro interior mínimo de 12 cm, cuyo destino será recibir los tamices.
- Probetas graduadas de 100 ml
- Un dosificador de 25 ml
- Vasos de precipitado de una capacidad de 3 litros.
- Una cuchara o una varilla de vidrio para agitar el líquido de digestión en el vaso de precipitado.
- Una jeringa de plástico y un tubo de aspiración.
- Una cuchara graduada de 6 g.
- Un termómetro de una precisión de + / - 0,5°C, con una graduación de 1 a 100°C
- Un vibrador, por ejemplo una afeitadora eléctrica sin cabeza.
- Un relé que se encienda y apague cada minuto.
- Un triquinoscopio provisto de un tabla horizontal o un estereomicroscopio que disponga de una iluminación adecuada.



- Una cubeta para el cómputo de larvas (en caso de utilización de un triquinoscopio).

La cubeta deberá estar formada por placas acrílicas de un espesor de 3 mm. y deberá presentar las siguientes características:

- fondo de la cubeta: 180 por 40 mm., dividido en cuadrados.
- placas laterales: 230 por 20 mm.
- placas frontales: 40 por 20 mm.

El fondo y las placas frontales deberán estar fijos entre las placas laterales de manera que formen dos pequeñas asas en los dos extremos. La parte superior del fondo deberá estar entre 7 y 9 mm más elevada con relación a la base del cuadrado formado por las placas laterales y frontales. Fijar las placas mediante una cola adecuada al material.

- En caso de utilización del estereomicroscopio, varias placas de Petri de un diámetro de 9 cm, cuyo fondo esté dividido en cuadrados de 10 por 10 mm, mediante un instrumento puntiagudo.

Solución de Acido Clorhídrico 17,5%.

- Concentración de Pepsina: 1:10.000 N.F. (U. S. National Formulary); correspondiente a 1:12.500 B.P. (British Pharmacopea), correspondiente a 2.000 F.I.P. (Federación Internacional de Farmacia).

- Varios cubos de 10 litros que se utilizarán en el momento de la descontaminación del instrumental, mediante un tratamiento como el formol y para el jugo digestivo que quede en caso de resultado positivo.

- Una balanza de una precisión de 0,1 g.

b) Toma de muestras:

1 -Cuando las canales estan enteras, tomar una muestra, de aproximadamente 4 g, en uno de los pilares del diafragma, en la zona de transición entre la parte muscular y la parte tendinosa; si no hubiere pilar del diafragma, tomar la misma cantidad en la parte del diafragma situada cerca de las costillas o del esternón o en la musculatura de la lengua o en los músculos masticadores o también en la musculatura abdominal.

2 -Para los trozos de carne, tomar una muestra de aproximadamente 4 g en los músculos esqueléticos que contengan poca grasa y en la medida que sea posible, cerca de los huesos o de los tendones.

c) Método:

1 - Procedimiento de digestión:

Grupos completos de muestras (50 a la vez):

- Proveer al Stomacher Lab-blender 3.500 de una pequeña bolsa doble de plástico y regular la temperatura en 40 a 41°C.

- Verter un litro y medio de agua caliente a 32 – 35° C en la pequeña bolsa interior y llevarla 40 – 41°C.

- Trasladar a la pequeña bolsa 25 ml. de la solución de ácido clorhídrico al 17,5%.

- Luego agregar 50 muestras de aproximadamente 2 gr. cada una (a 25 – 30°C) tomadas de cada una de las muestras individuales, de acuerdo con el procedimiento contemplado en la letra b).

- Por último, agregar 6 gr. de pepsina. Respetar escrupulosamente el orden de las operaciones, para evitar la descomposición de la pepsina.
- Triturar en el Stomacher durante 25 minutos.
- Quitar la pequeña bolsa de plástico del Stomacher, filtrar el líquido de digestión a través de un tamiz y dejarlo pasar a un vaso de precipitado de 3 l.
- Lavar la pequeña bolsa de plástico con 100 ml. de agua, aproximadamente, que luego se utilizarán para enjuagar el tamiz y se agregará al filtrado que contenga el vaso de precipitado.

Se podrá agregar un máximo de 7 muestras individuales a un grupo completo de 50 muestras para examinarlas al mismo tiempo que estas últimas.

ii) Grupos de menos de 50 muestras:

- Proveer al Stomacher Lab Blender 3.500 de una pequeña bolsa doble de plástico y regular la temperatura en 40 a 41°C.
- Preparar un líquido de digestión, mezclando aproximadamente, 1.500 ml de agua y 25 ml de ácido clorhídrico de 17,5%. Agregar 6 g de pepsina y mezclar todo a una temperatura de 40 – 41°C. Respetar escrupulosamente el orden de las operaciones, para evitar la descomposición de la pepsina.
- Determinar un volumen de líquido de digestión

correspondiente a 30 ml/ muestra (así, para 15 muestras, - para muestras de 2 g - habrá que extraer 15 x 30 ml = 450 ml) y traspasarlo a la pequeña bolsa de plástico interior, al mismo tiempo que las muestras de carne, de aproximadamente 2 g (a 25 – 30°C) tomadas de cada una de las muestras individuales, de acuerdo con el procedimiento contemplado en la letra b),

- Verter el agua a aproximadamente 41°C en la pequeña bolsa exterior hasta obtener un volumen total de 1.500 ml en las dos pequeñas bolsas.
- Triturar en el Stomacher durante 25 minutos.
- Quitar la pequeña bolsa de plástico del Stomacher, filtrar el líquido de digestión a través de un tamiz y dejarlo pasar a un vaso de precipitado de 3.000 ml.
- Lavar la pequeña bolsa de plástico con 100 ml. de agua, aproximadamente, que luego se utilizará para enjuagar el tamiz y que se añadirá al filtrado que contenga el vaso de precipitado.

2 - Aislamiento de las larvas por sedimentación: - Agregar al líquido de digestión 300 - 400 g de hielo en laminillas o de hielo triturado para obtener un volumen de 2l, aproximadamente. Agitar hasta que el hielo se funda. En el caso de grupos más pequeños (ver letra ii), la cantidad de hielo deberá reducirse proporcionalmente.

- Traspasar el líquido de digestión enfriado a un embudo de separación de 2l. provisto de un vibrador que se habrá fijado mediante una pinza suplementaria.
- Para la sedimentación, dejar el líquido en el embudo de separación durante 30 minutos, alternando un minuto de vibración y un minuto de pausa.
- Después de 30 minutos, introducir rápidamente 60 ml. de sedimento en una probeta graduada de 100 ml (Después de su utilización, enjuagar el embudo con una solución detergente).

- Dejar reposar la muestra de, por lo menos, 60 ml quitar por aspiración el líquido sobrenadante hasta dejar en la probeta un volumen de 15 ml que se examinará para investigar la presencia de larvas.

- Para la aspiración utilizar una jeringa de plástico desechable, provista de un tubo de plástico.

La longitud del tubo deberá permitir que en la probeta graduada queden 15 ml del líquido cuando el cuello de la jeringa se encuentre al nivel del borde del cilindro.

- Introducir los 15 ml restantes en una cubeta para el cómputo de larvas o en dos placas de Petri y examinarlas en el triquinoscopio o en el estereomicroscopio.

- Los líquidos de digestión se deberán examinar desde el momento en que estén dispuestos. En ningún caso se podrá postergar el examen para el día siguiente.

Si los líquidos de digestión no fueran lo suficientemente transparentes o si no se examinaran en el plazo de 30 minutos siguientes a su preparación, se deberán clarificar de la siguiente manera: verter la muestra final, de 60 ml. en una probeta graduada y dejar sedimentar durante 10 minutos. Después de dicho tiempo, quitar por aspiración, 45 ml del líquido sobrenadante y agregar agua de grifo a los 15 ml restantes hasta obtener un volumen total de 45 ml.

Después de un nuevo período de reposo de 10 minutos, quitar por aspiración 30 ml del líquido sobrenadante, verter los 15 ml restantes en una placa de Petri o en una cubeta para cómputo de larvas, con vistas a su examen. Lavar la probeta graduada con 10 ml de agua de grifo; agregar el líquido obtenido a la muestra en la placa de Petri o en la cubeta de cómputo de larvas y examinar.

3 -En caso de resultado positivo o dudoso del examen de una muestra colectiva, se deberá tomar una muestra de 20 g de cada cerdo, de acuerdo con las indicaciones contempladas en la anterior letra b). Las muestras de 20 g procedentes de 5 cerdos se deberán reunir y examinar de acuerdo con el método arriba descrito.

De esta forma se examinarán las muestras de 10 grupos de 5 cerdos. Si se descubrieran las triquinas en un grupo de muestras de 5 cerdos, se deberán tomar las muestras de 20 g de cada animal que pertenezca a dicho grupo y se deberán examinar de acuerdo con el método arriba descrito.

4 - Método de la Digestión de Muestras Colectivas con Asistencia Mecánico/Técnica del Aislamiento por Filtración:

a) Instrumental y Reactivos:

- Un cuchillo o tijeras para cortar las muestras.

- Bandejas divididas en 50 cuadrados que puedan contener, cada uno, muestras de carne de 4 g, aproximadamente.

- Un Stomacher Lab-blender 3.500, Thermo model.

- Bolsas de plástico adaptadas al Stomacher Lab-blender.

- Embudos de separación cónicos de una capacidad de 2 litros, preferentemente provistos de llaves de seguridad de Teflon.

- Soportes con anillos y fijaciones.

- Tamices, finura de malla 177 micrones, de un diámetro exterior de 11 cm, provistos de una rejilla de acero inoxidable.

- Embudos de un diámetro interior mínimo de 12 cm, cuyo destino será recibir los tamices.
- Probetas graduadas de 100 ml.
- Un dosificador de 25 ml.
- Vasos de precipitado de una capacidad de 3 litros.
- Una cuchara o una varilla de vidrio para agitar el líquido de digestión en el vaso de precipitado.
- Una jeringa de plástico y un tubo de aspiración.
- Una cuchara graduada de 6 gr.
- Un termómetro de una precisión de  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , con una graduación de 1 a  $100^{\circ}\text{C}$ .
- Un vibrador, por ejemplo una afeitadora eléctrica sin cabeza.
- Un relé que se encienda y apague cada minuto.
- Un triquinoscopio provisto de una tabla horizontal o un estereomicroscopio que disponga de una iluminación adecuada.
- Una cubeta para el cómputo de larvas (en caso de utilización de un triquinoscopio).

La cubeta deberá estar formada por placas acrílicas de un espesor de 3 mm y deberá presentar las siguientes características:

- i) fondo de la cubeta: 180 por 40 mm, dividido en cuadrados.
- ii) placas laterales: 230 por 20 mm.
- iii) placas frontales: 40 por 20 mm.

El fondo y las placas frontales deberán estar fijos entre las placas laterales de era que formen dos pequeñas asas en los dos extremos. La parte superior del fondo deberá estar entre 7 y 9 mm más elevada, con relación a la base del cuadrado formado por las placas laterales y frontales. Fijar las placas mediante una cola adecuada al material.

- En caso de utilización de un estereomicroscopio, varias placas de Petri de un diámetro de 9 cm, cuyo fondo esté dividido en cuadrados de 10 por 10 mm, mediante un instrumento puntiagudo.
- Solución de Acido Clorhídrico 17,5%.
- Concentración de Pepsina: 1:10.000 N.F. (U.S. National Formulary); correspondiente a 1:12.500 B.P. (British Pharmacopea); correspondiente a 2.000 FIP. (Federación Internacional de Farmacia).
- Varios cubos de 10 litros que se utilizarán en el momento de la descontaminación del instrumental, mediante un tratamiento como el formol y para el jugo digestivo que quede en caso de resultado positivo.
- Una balanza de precisión de 0,1 g.
- Un embudo Gelman de 11. con soporte para filtro (diámetro del soporte; 45 mm).

- Discos filtrantes compuestos de: una rejilla redonda de acero inoxidable, finura de malla de 35 micrones, diámetro del disco: 45 mm, dos anillos de goma de 1 mm de espesor; diámetro exterior: 45 mm; diámetro interior: 38 mm.

La rejilla se deberá colocar entre los anillos y se fijará con una cola de dos componentes que se adapte a los dos materiales.

- Un matraz Erlenmeyer de 31. provisto de un tubo lateral para aspiración.

- Una bomba de filtración.

- Bolsas pequeñas de plástico de una capacidad mínima de 80 ml.

- Un saco de sosa.

- «Rennilase» 1:150.000 unidades Soxlet por gramo.

b) Toma de Muestras:

1) - Cuando las canales estén enteras, tomar una muestra, de aproximadamente 4 gr., en uno de los pilares del diafragma, en la zona de transición entre la parte muscular y la parte tendinosa; si no hubiere pilar del diafragma, tomar la misma cantidad en la parte del diafragma situada cerca de las costillas o del esternón o en la musculatura de la lengua o en los músculos masticadores o también en la musculatura abdominal.

2) - Para los trozos de carne, tomar una muestra de aproximadamente 4 g en los músculos esqueléticos que contengan poca grasa y en la medida que sea posible, cerca de los huesos o de los tendones.

c) Método:

1- Procedimiento de Digestión:

i) Grupos completos de muestras (50 a la vez):

- Proveer al Stomacher Lab Blender 3.500 de una pequeña bolsa doble de plástico y regular la temperatura en 40 a 41°C.

- Verter un litro y medio de agua caliente a 32 – 35°C en la pequeña bolsa interior y llevarla a 40 – 41°C.

- Trasladar a la pequeña bolsa 25 ml de la solución de ácido clorhídrico al 17,5%.

- Luego agregar 50 muestras de aproximadamente 2 g cada una (a 25 – 30°C) tomadas de cada una de las muestras individuales, de acuerdo con el procedimiento contemplado en la letra b).

- Por último, agregar 6 g de pepsina. Respetar escrupulosamente el orden de las operaciones, para evitar la descomposición de la pepsina.

- Triturar en el Stomacher durante 25 minutos.

- Quitar la pequeña bolsa de plástico del Stomacher, filtrar el líquido de digestión a través del tamiz y dejarlo pasar a un vaso de precipitado de 31.

- Lavar la pequeña bolsa de plástico con 100 ml de agua, aproximadamente, que luego se utilizarán para enjuagar el tamiz y se agregará al filtrado que contenga el vaso de precipitado.

- Se podrá agregar un máximo de 15 muestras individuales a un grupo completo de 100 muestras para examinarlas al mismo tiempo que estas últimas.

ii) Grupos de menos de 50 muestras:

- Proveer al Stomacher Lab-Blender 3.500 de una pequeña bolsa doble de plástico y regular la temperatura en 40 – 41°C.
- Preparar un líquido de digestión mezclando, aproximadamente, 1.500 ml. de agua y 25 ml. de ácido clorhídrico de 17,5%, agregar 6 gr. de pepsina y mezclar todo a una temperatura de 40 – 41°C.
- Respetar escrupulosamente el orden de las operaciones para evitar la descomposición de la pepsina.
- Determinar un volumen de líquido de digestión correspondiente a 30 ml por muestra (así, para 15 muestras - para muestras de 2 g habrá que extraer 30 x 15 ml = 450 ml) y traspasarlo a la pequeña bolsa de plástico interior, al mismo tiempo que las muestras de carne de aproximadamente 2 g (a 25 – 30°C) tomadas de cada una de las muestras individuales, de acuerdo con el procedimiento contemplado en la letra b).
- Verter el agua a, aproximadamente 41°C en la pequeña bolsa exterior hasta obtener un volumen total de 1.500 ml en las dos pequeñas bolsas.
- Triturar en el Stomacher durante 25 minutos.
- Quitar la pequeña bolsa de plástico del Stomacher, filtrar el líquido de digestión a través de un tamiz y dejarlo pasar a un vaso de precipitado de 3.000 ml.
- Lavar la pequeña bolsa de plástico con 100 ml de agua, aproximadamente, que luego se utilizará para enjuagar el tamiz y que se añadirá al filtrado que contenga el vaso de precipitado.

2.- Aislamiento de las larvas por filtración:

- Agregar al líquido de digestión 300 - 400 g de hielo en laminillas o de hielo triturado para obtener un volumen de aproximadamente 2l. En el caso de grupos más pequeños, la cantidad de hielo deberá reducirse proporcionalmente.
- Agitar el líquido de digestión hasta que el hielo se funda. Dejar reposar el líquido de digestión enfriado durante 3 minutos por lo menos, para que las larvas puedan enrollarse.
- Colocar el embudo Gelman provisto de un soporte para filtro, en el cual se encuentra un disco filtrante, sobre un matraz Erlenmeyer conectado a una bomba de filtración.
- Introducir el líquido de digestión en el embudo Gelman y filtrar. Hacia el final, se podrá acelerar el paso del líquido a través del filtro procediendo a una aspiración mediante la bomba de filtración. Terminar la aspiración exactamente antes de que el filtro se seque, es decir cuando en el embudo quedan entre 2 y 5 ml de líquido.
- Después de la filtración de todo el líquido de digestión, quitar el disco filtrante y colocarlo en una pequeña bolsa de plástico de 80 ml agregando de 15 a 20 ml de solución de «rennilase». Para obtener la solución de rennilase, se introducirán 2 g de rennilase en 100 ml de agua de grifo.
- Practicar una doble soldadura en la pequeña bolsa de plástico y colocarla en el Stomacher entre la pequeña bolsa interior y la pequeña bolsa exterior.
- Triturar en el Stomacher durante 3 minutos, por ejemplo; entretanto, el aparato se utilizará para el análisis de un grupo completo o incompleto de muestras.

- Después de 3 minutos, quitar del Stomacher la pequeña bolsa de plástico que contiene el disco filtrante y la solución de rennilase y abrirla con la ayuda de tijeras. Introducir el líquido en una cubeta para el cómputo de larvas o en una placa de Petri.

Lavar la pequeña bolsa con 5 o 10 ml de agua, que luego se introducirán en la cubeta para la triquinoscopía o en una placa de Petri para examen en el estereomicroscopio.

- Los líquidos de digestión deberán examinarse desde el momento en que estén dispuestos. En ningún caso se podrá postergar el examen para el día siguiente.

Nota: no utilizar nunca discos filtrantes que no estén perfectamente limpios. No secar nunca discos filtrantes si no están limpios. Para limpiar los discos, es preciso dejarlos en una solución de rennilase durante la noche. Antes de su utilización, se deberán lavar en el Stomacher en una solución de rennilase.

3 - En caso de resultado positivo dudoso del examen de una muestra colectiva, se deberá tomar una muestra de 20 g de cada cerdo, de acuerdo con las indicaciones contempladas en la anterior letra b). Se deberán reunir las muestras de 20 g procedentes de 5 cerdos y examinarlas de acuerdo con el método anterior. De esta forma se examinarán las muestras de 10 grupos de 5 cerdos. Si se descubrieran las triquinas en un grupo de muestras de 5 cerdos, se deberán tomar las muestras de 20 g de cada animal que pertenezca a dicho grupo y se examinarán de acuerdo con el método arriba descrito.