



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE DIGESTIÓN ARTIFICIAL PARA EL
DIAGNÓSTICO DE *Trichinella spirallis* EN DILAVE URUGUAY”**

“por”

Soledad BIRRIEL SOSA

TESIS DE GRADO presentada
como uno de los requisitos para
obtener el título de Doctor en
Ciencias Veterinaria (Inspección,
Higiene-Control y Tecnología de
los Alimentos)

MODALIDAD Estudio de caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2017**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Lic. Oscar Castro

Segundo miembro:

Dra. Valeria Gayo

Tercer Miembro:

Prof. Oscar Correa

Cuarto Miembro:

Dra. Soledad Valledor

Fecha: _____

Autor: _____
Soledad Birriel Sosa

DEDICATORIA

A mis chiquititas, mi fuerza, mi amor y mi alegría.

A la abuela Mabel, tus consejos aún resuenan en mi mente.

A toda mi familia, no tengo palabras para agradecerles. Espero que la vida me dé la oportunidad de devolverles todo el apoyo incondicional que me han brindado. A las abuelas (Mamá y Elena) por siempre cuidar de mis brujitas con tanta dedicación. A los abuelos compinches con los que siempre se puede contar (Papá, Tata y Oscar). A las tías compañeras de juegos y diversión (Paula, Inés, Fede, Caro y Mechi). Y por último pero muy especialmente a Javier no sólo por ser el mejor compañero que alguien puede pedir, sino por ser mi mejor amigo y apoyarme siempre, tu diste el punta pie decisivo en esta última etapa.

Gracias, gracias, gracias... infinitas gracias!

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Valeria Gayo quien me apoyó 100% en todo momento y me dio el espacio para crecer y aprender, soy quien soy académicamente gracias a ti.

A mi co-tutora Soledad Valledor no sólo por ser una muy buena guía en cuanto a lo académico, sino por la buena onda y apoyo en mis momentos de mayor ansiedad.

A Brad Scandrett en representación del CFAP, quien no sólo nos envió todo el material biológico que le pedimos en todas las oportunidades sin dudarle un momento, sino que su apoyo técnico fue insuperable.

A la dirección de DILAVE por habernos permitido ingresar el material biológico al país y proporcionarnos la pepsina.

A todos los integrantes del Laboratorio de Parasitología del DILAVE, en especial a María Angélica Solari quien a través de su experiencia nos guió innumerables veces, a Eduardo Rizzo quien con sus conocimientos nos ayudó a salir adelante y fuimos grandes compañeros de laboratorio y a Alfredo Trelles porque gracias al ingenio que lo caracteriza nos inventó alguna que otra herramienta que nos facilitó el trabajo. A todos por la buena onda y el cariño que siempre me brindaron.

A PLANISA por confiar en nuestro proyecto y brindarnos la beca.

A Oscar Castro y Gustavo Castro por darme una mano enorme con la información bibliográfica de los antecedentes de *Trichinella* en Uruguay.

A Carlos Olalde por hacer hasta lo imposible para que pudiera obtener las muestras de Cerdos y a Jorge Busi por permitirnos hacerlo.

A Ana Carrió por organizar todo para que me recibieran en planta.

Al Frigorífico SAREL por proporcionarnos las muestras.

A Natalia Cruz, como me hubiera gustado llegar juntas hasta el final!

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
LISTA DE TABLAS.....	6
1. RESUMEN.....	8
2. SUMMARY.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1. Ciclo de vida.....	12
4.2. Especies y taxonomía.....	13
4.3. Epidemiología.....	13
4.4. Diagnóstico en animales.....	14
4.4.1. Métodos directos.....	14
4.4.2. Técnicas moleculares.....	15
4.4.3. Técnicas serológicas.....	15
4.5. Métodos de procesamiento de la carne post faena.....	16
4.6. La triquinosis en el hombre.....	16
5. OBJETIVOS.....	18
5.1. Objetivo general.....	18
5.2. Objetivos específicos.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1. <u>Puesta a punto de la Técnica de DA</u>	19
6.1.1. Descripción del Material Biológico.....	19
6.1.2. Digestión Artificial.....	19
6.1.3. Criterio de Evaluación de los resultados (muestras de pro-eficiencia).....	20
6.2. <u>Obtención y procesamiento de muestras de campo</u>	20
6.2.1. Muestras de Jabalíes.....	20
6.2.2. Muestras de Equinos.....	21
6.2.3. Muestras de Cerdos.....	22
6.3. <u>Infección experimental de ratones y elaboración de muestras de pro-eficiencia</u>	22

6.3.1. Infección de ratones.....	22
6.3.2. Elaboración de muestras de pro-eficiencia.....	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1. Muestras de pro-eficiencia CFAP.....	24
7.1.1. Primer Instancia.....	24
7.1.2. Segunda Instancia.....	24
7.1.3. Tercer Instancia.....	25
7.2. Muestras de campo.....	26
7.2.1. Muestras de Jabalíes.....	26
7.2.2. Muestras de Equinos.....	26
7.2.3. Muestras de cerdos.....	26
7.3. Infección de ratones y muestras de proeficiencia DILAVE.....	26
7.3.1. Infecciones de ratones.....	26
7.3.2. Muestras de pro-eficiencia DILAVE.....	26
8. DISCUSIÓN.....	27
9. CONCLUSIONES.....	30
10. BIBLIOGRAFÍA.....	31
ANEXO I - PROTOCOLO DE TÉCNICA DE DIGESTIÓN ARTIFICIAL.....	33
ANEXO II – PROTOCOLO DE ELABORACIÓN DE KITS DE MUESTRAS DE PRO-EFICIENCIA.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Siglas y abreviaturas.....	7
Tabla 2. Especies y genotipos de <i>Trichinella</i> y sus principales características.....	13
Tabla 3. Grupos de muestras de Jabalíes.....	21
Tabla 4. Grupos de muestras de equinos.....	21
Tabla 5. Grupos de muestras de cerdos.....	22
Tabla 6. Resultados de muestras del Kit M.....	24
Tabla 7. Resultados de muestras del Kit N.....	24
Tabla 8. Resultados de muestras del Kit B.....	25
Tabla 9. Resultados de muestras del Kit W.....	25
Tabla 10. Resultados de muestras del Kit X.....	25
Tabla 11. Resultados Positivos de las muestras de pro-eficiencia elaboradas.....	26

Tabla 1. Siglas y abreviaturas.

CFAP	- Centre for Food-Borne and Animal Parasitology (Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon Laboratory)/ Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico Veterinario del Centro de Parasitología Alimentaria y Animal, perteneciente a la Agencia Canadiense de Inspección de alimentos en Saskatoon
DA	- Digestión Artificial
DILAVE	- División de Laboratorios Veterinarios
ELISA	- Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay/ ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HCl	- Ácido clorhídrico
ICT	- International Commission on Trichinelosis/Comisión Internacional de Triquinelosis
Lpg	- Larvas por gramo
MGAP	- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
NBL	- New Born Larvae/ Larvas recién nacidas o embriónes
NF	- National Formulary/Formulario Nacional
OIE	- Organización Mundial de Sanidad Animal, anteriormente Organización Internacional de Epizootias
PBS	- Phosphate buffered salino/tampón fosfato salino
PCA	- Plate Count Agar/Recuento en placa (en realidad se refiere al medio de cultivo)
PCR	- Polimerasa chain reaction/reacción en cadena de la polimerasa
PVC	- Policloro de vinilo (material termoplástico)
UE	- Unión Europea

1. RESUMEN

La triquinosis es una zoonosis parasitaria causada por nematodos pertenecientes al género *Trichinella* que son encontrados en muchos animales de sangre caliente, incluido el hombre. Las infecciones ocurren en los seres humanos principalmente a través de la carne infectada cruda o semi cruda de cerdos o caballos (ciclo doméstico) o de fauna silvestre infectada, por ejemplo, jabalí (ciclo selvático). La enfermedad se encuentra distribuida a lo largo de todos los continentes, con excepción de la Antártida. El presente estudio se llevó a cabo en el Departamento de Parasitología de la DILAVE “Miguel C. Rubino” – MGAP con el objetivo de poner a punto la técnica de digestión artificial para el diagnóstico de *Trichinella spiralis* en diferentes especies. Para ello fue solicitado material de referencia al “Centre for Food-Borne and Animal Parasitology, Canadian Food Agency, Saskatoon Laboratory” (laboratorio de referencia en *Trichinella* para la OIE). Dichos materiales (muestras de pro-eficiencia) fueron procesados en su totalidad en sus diferentes instancias de ingreso al país, evidenciándose una notoria mejoría en la performance de la técnica y obteniéndose finalmente resultados acordes a los de un analista capacitado. A su vez se realizó el procesamiento (digestión artificial) de 30 muestras de cerdos, 10 equinos y 156 jabalíes, por considerarse las especies más susceptibles de adquirir esta parasitosis presentes en nuestro país. Se obtuvieron resultados negativos en todos ellos lo cual era esperado dado que la enfermedad no es diagnosticada en nuestro país desde 1919. Además, se realizó la infección experimental de ratones con larvas de *Trichinella spiralis*, con el objetivo de seguir profundizando los estudios referentes al tema. Finalmente, los resultados nos permiten concluir que este estudio nos permitió ser capaces de realizar un diagnóstico de *Trichinella spiralis* por la técnica de digestión artificial con la capacidad de un analista de laboratorio entrenado.

2. SUMMARY

Trichinosis is a parasitic zoonosis caused by nematodes from *Trichinella* genus which are found in many warm blooded animals including humans. Infections in humans occur mainly by the consumption of raw or semi raw infected swine or horse meat (domestic cycle) or wild infected meat, for example from wild pigs (sylvatic cycle). The disease is distributed worldwide with the exception of Antarctica. This study was carried out at the Parasitology Department of DILAVE "Miguel C. Rubino" – MGAP (Ministry of Agriculture, Livestock and Fisheries) with the aim of performing artificial digestion for *Trichinella spiralis* diagnosis in different species. To do this, reference materials were requested from the "Centre for Food-Borne and Animal Parasitology, Canadian Food Agency, Saskatoon Laboratory" (reference laboratory in *Trichinella* for OIE). Those materials (proficiency samples) were wholly processed in the different times they came to our country, and they showed a remarkable improvement in the techniques, and finally results were appropriate from a trained analyst's viewpoint. We also processed 30 swine, 10 horse and 156 wild pig samples (artificial digestion), as those species are considered the most susceptible species to the parasite in our country. Negative results were obtained from all of them which was expected since the disease is not diagnosed in Uruguay since 1919. Experimental infection of mice with *Trichinella spiralis* larvae was also performed in order to be able to continue with more studies concerning this pathogen. Finally, we can conclude that this study allowed us to be able to perform artificial digestion to diagnose *Trichinella spiralis* in different species with results that are compatible with a well-trained laboratory analyst.

3. INTRODUCCIÓN

La triquinosis es una zoonosis parasitaria causada por nematodos pertenecientes al género *Trichinella* que son encontrados en muchos animales de sangre caliente, incluido el hombre. Las infecciones ocurren en los seres humanos principalmente a través de la carne infectada cruda o semi cruda de cerdos o caballos (ciclo doméstico) o de fauna silvestre infectada, por ejemplo, jabalí (ciclo selvático). La enfermedad se encuentra distribuida a lo largo de todos los continentes, con excepción de la Antártida (Pozio, 2007).

Argentina y Chile constituyen los países de nuestra región que se encuentran más afectados por esta enfermedad. Tanto en Chile como en Argentina la *Trichinella* spp. se encuentra extendida en todo el territorio, estando presente tanto en animales domésticos como silvestres presentándose además todos los años casos en humanos (Pozio, 2007). Entre 1990 y 2005 en Argentina hubieron 5221 casos de triquinosis en humanos, mientras que en Chile entre 1991 y 2004 fueron 698 casos humanos. (Murrell y Pozio, 2011)

En nuestro país los primeros registros indican que en 1911 se realizó el primer hallazgo en carne de cerdo proveniente de un matadero en Montevideo (Andrade y Rodríguez, 1911). Entre noviembre de 1913 y octubre de 1914 la Inspección Nacional de la Policía Sanitaria Animal encontró 29 cerdos triquinosos sobre 19.525 investigados utilizando la técnica de triquinoscopía (Wolffühugel, 1916). Se siguen registrando más infecciones en mataderos (Tálice, 1943) por lo que se incluye a la triquinosis en la Lista de enfermedades a las que se aplicarán las medidas establecidas en la Ley 3.606 del 13 de abril de 1910.

En 1919 se describe el primer caso de triquinosis humana en Uruguay, se trata de una familia de origen alemán infectada por el consumo de carne de cerdo cruda. Todos los miembros de la familia mostraron edemas localizados en los párpados y una persona enfermó gravemente. La confirmación del diagnóstico a través de una muestra de la carne realizada por el Instituto de Anatomía Patológica y Parasitología de la Escuela de Veterinaria constató que jamón de la misma procedencia que la consumida por los enfermos estaba triquinosa, confirmándose después por el mismo Instituto la presencia de triquinas en la musculatura del enfermo a través de una biopsia (López Lindner, 1922; Wolffhügel, 1919).

Más adelante en una publicación de Salsamendi y Bertullo en 1945 describen que desde el 3 de marzo de 1944 se habían empezado a efectuar triquinoscopías de 5 muestras por cerdo, con trozos musculares de las regiones diafragmáticas, laringe, maseterina e intercostal. Hasta el 11 de mayo de 1945 se efectuaron 346.640 triquinoscopías correspondientes a 68.198 cerdos, con un resultado siempre negativo. También se examinaron por el mismo método 42 ratas obtenidas del Servicio de Desratización del Frigorífico Nacional, con resultados negativos. Además, en ese mismo período, se hicieron digestiones pépticas de muestras de 25 gr. de músculo de 2000 cerdos y de 43 ratas, siempre con resultados negativos. Y finalmente, luego de haber faenado bajo control sanitario más de 1 millón y medio de cerdos por medio de triquinoscopía, y no habiéndose constatado un solo quiste triquinósico, los autores concluyeron que las medidas antitriquinosas aplicadas en el

año 1919 por la Dirección de Ganadería fueron de tal eficacia que, desde esa fecha, no se había vuelto a constatar triquinosis porcina en nuestro país (Salsamendi y Bertullo, 1945).

Por otro lado, Talice en 1943 mediante varias publicaciones pone en duda el correcto desempeño de las medidas sanitarias aplicadas alegando que el procesado de muestras que se realizaba era insuficiente. Su convicción era que la enfermedad aún se encontraba presente debido a revisiones de casos de la época y la digestión artificial de muestras de 100 diafragmas de cadáveres de los cuales se recuperaron larvas en 3 de ellos (Talice y Fiandra, 1943; Talice, 1943).

Por último, entre 1996 y 1997 se analizaron más de 60.000 cerdos procedentes de diferentes lugares del país sin detectar casos positivos (Steffan, 2006), suspendiéndose en el año 2000 el muestreo para la identificación de *Trichinella* spp. en cerdos a fin de revisar los procedimientos de control (decisión interna de la División Industria Animal de la División General de Servicios Ganaderos). Actualmente el diagnóstico en nuestro país se realiza en las plantas de faena de equinos debido a las exigencias de los países a los cuales exportan sus productos (INAC, 2017; European Union, 2015).

Dada la situación regional respecto a la triquinosis y la relevancia de la misma debida fundamentalmente por su carácter de zoonosis es que se considera de suma importancia poner a punto técnicas de referencia para su diagnóstico, y de este modo proporcionar información con solvencia experimental en cuanto a la situación epidemiológica de nuestro país.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los nematodos integrantes del género *Trichinella* son los agentes causantes de la enfermedad zoonótica conocida como triquinelosis y se encuentran distribuidos en un gran rango de especies animales a lo largo de todo el mundo. El que estos parásitos sean capaces de afectar al hombre no sólo convierte a la enfermedad en un peligro para la Salud Pública, sino que también representa un problema económico para la industria animal (principalmente la del cerdo) y la Seguridad Alimentaria.

La infección en el hombre suele darse en personas que consumen productos crudos o insuficientemente cocidos de carne de animales domésticos o salvajes que se encuentran infectados con las larvas de *Trichinella*. La carne de cerdo es considerada la más importante fuente de infección para el hombre, pero en el último tiempo la carne de equinos y jabalíes (entre otros animales de caza) ha surgido también como causa de la misma. (Pozio, 2014).

4.1. Ciclo de vida

Es directo y enteramente parasitario. Se le conoce como autoheteroxeno, porque un mismo hospedador soporta todas las fases del ciclo: el intestino como hospedador definitivo; la circulación y el tejido muscular estriado, como hospedador intermediario. Está sostenido por el hábito depredador, caníbal o carroñero de los hospedadores y su ciclo se repite tantas veces como su hospedador es ingerido por otro de la misma o diferente especie e incluye un amplio rango de especies hospedadoras (mamíferos, aves y reptiles) (Martínez, 2002).

La infección se inicia al ingerirse la carne infectada con larvas de *Trichinella spp.* que son liberadas mediante la acción del jugo gástrico y son transportadas pasivamente por el peristaltismo al intestino (duodeno). Cada larva se introduce en una columna de enterocitos, que, al difundir sus citoplasmas, forman el sincitio de albergue de los juveniles preadultos donde sufren cinco fases separadas por cuatro mudas. Hacia el tercer día, las hembras del V estadio se transforman en adultos y copulan con los machos de los sincitios contiguos. Las hembras ponen los embriones (larvas recién nacidas o NBL por sus siglas en inglés, new born larvae) a los 5 a 7 días post infección directamente en la submucosa. Las NBL atraviesan la lámina basal, alcanzando así a los capilares portales y linfáticos de la microvellosidad y los vasos sanguíneos del hospedador. Esto les permite ser transportadas a los lugares de predilección (músculos altamente oxigenados) donde penetran. Luego de haber ingresado a las “células nido”, las NBL se desarrollan a la forma infectiva muscular sin mudar (esta L1 mide entre 0,65 a 1,45 mm de largo y 0.026 a 0.040mm de ancho). Esta maduración se completa aproximadamente al día 15-17. Luego de varias semanas, se establece la respuesta inmuno mediada del hospedero, y los adultos en intestino son eliminados (Martínez, 2002; Gottstein y col., 2009).

En las “células nido” musculares las larvas parasitarias pueden sobrevivir por años, pudiéndose llegar a dar la calcificación de la cápsula (en caso de ser una especie encapsulada), la “célula nido” y la larva. Este estado hipobiótico es mantenido hasta ser ingerido por un nuevo hospedador (Gottstein y col., 2009).

4.2. Especies y taxonomía

Gracias a nuevos estudios de diversidad genética se sabe que actualmente el género *Trichinella* se encuentra formado por 8 especies y cuatro genotipos, no existen diferencias morfológicas entre las especies y los genotipos, por lo cual el único modo de distinguirlas es mediante el uso de análisis moleculares. A su vez se pueden subdividir en encapsuladas o no encapsuladas (esto depende de si forman o no forman cápsula de colágeno al enquistarse en el músculo de su hospedero) o también en resistentes o no resistentes al congelamiento (tabla 2).

Tabla 2. Especies y genotipos de *Trichinella* y sus principales características.

Especies o genotipos	Encapsulada	Resistente al congelamiento
<i>T. spiralis</i>	si	si, en carne de caballo
<i>T. nativa</i>	si	si
<i>T. genotipo T6</i>	si	si
<i>T. britovi</i>	si	si
<i>T. genotipo T8</i>	si	no
<i>T. murrelli</i>	si	no
<i>T. genotipo T9</i>	si	no
<i>T. nelsoni</i>	si	no
<i>T. genotipo T12</i>	si	no se sabe
<i>T. pseudospiralis</i>	no	no
<i>T. papuae</i>	no	no
<i>T. zimbabwensis</i>	no	no

(Gottstein y col., 2009)

Aunque muchas de ellas son capaces de infectar al hombre la de mayor relevancia es *T. spiralis* ya que es la de mayor infectividad para el cerdo (entre otras especies como equinos y jabalíes), mientras que las demás tienden a infectar con mayor frecuencia a animales silvestres (Gottstein y col., 2009)

4.3. Epidemiología

En el caso de esta enfermedad podemos encontrar dos ciclos epidemiológicos bien marcados: el doméstico y el selvático, aunque en ocasiones los mismos pueden interactuar (Pozio, 2007).

El ciclo doméstico es dependiente del hombre y su cultura zootécnica. Puede diferenciarse en dos variedades:

- Urbano: el cual se desarrolla entre el cerdo doméstico (infección con restos de mataderos, con canibalismo dentro de zahurdas masificadas, raboteo) este también puede darse en el caballo (por ejemplo, al ser alimentados con sobras de cerdo) o entre el cerdo y animales sinantrópicos (rata, gato, perro). Es característico de *T. spiralis*.

- Rural: cuando los cerdos se explotan de forma extensiva, en contacto con fauna silvestre. La infección es por carroñerismo, o coprofagia sobre heces de carnívoros a su vez reinfectados.

De este modo *T. spiralis* se extiende en el medio silvestre, y puede traer a la infección humana de *T. britovi* (Martínez, 2002).

En Canadá, Estados Unidos y la mayoría de los países de la Unión Europea, la infección por *Trichinella* en animales domésticos prácticamente ha desaparecido, aunque algunos focos esporádicos ocurren. Mientras que en América Central y Latina, la infección por *Trichinella* sigue siendo endémica en Argentina, Chile y México tanto en cerdos como en humanos. Mientras que en Asia se sigue dando en varios países incluyendo China (Gottstein y col., 2009).

El ciclo selvático es el que se da en los animales silvestres donde los hábitos de carroñerismo y carnivorismo son habituales. Este incluye a todas las especies de *Trichinella* y genotipos, incluyendo a *T. spiralis* en los mamíferos, *T. pseudospiralis* en mamíferos y aves y *T. papuae* y *T. zimbabwensis* en mamíferos y reptiles (Gottstein y col., 2009).

4.4. Diagnóstico en animales.

La sintomatología inespecífica de la enfermedad hace que el diagnóstico clínico en los animales sea muy difícil, por lo que se realizan para esto técnicas de laboratorio.

4.4.1. Métodos directos:

La inspección de carne para la detección de larvas de *Trichinella* está diseñada para prevenir la triquinelosis clínica en humanos, pero no para prevenir la infección. Generalmente se usan para identificar larvas de *Trichinella* de muestras de músculos de cerdos y otros animales destinados a consumo humano (por ejemplo, caballo, jabalí y oso) y está limitada a la inspección post mortem de las carcasas, aunque también pueden ser usados para el monitoreo de animales silvestres. Estos mismos para poder detectar las larvas necesitan tener una alta sensibilidad, la cual está sumamente influenciada por el tamaño de la muestra, el tipo de músculo para la toma de la misma y el método que se utilice (Gamble y col., 2000; Nöckler y Kapel, 2007; Gottstein y col., 2009).

Con el objetivo de determinar los diferentes lugares de predilección para la toma de muestras, se han llevado a cabo muchos estudios experimentales. Por ejemplo, en el cerdo doméstico los 3 lugares de predilección son los pilares del diafragma, la lengua y el músculo masetero. En el ANEXO I, Tabla 1. se describen cuáles son los músculos de predilección en las distintas especies y la cantidad de muestras necesarias para analizar y alcanzar así una sensibilidad correcta.

- La Digestión Artificial permiten examinar un pool de muestras de al menos 1 gr de músculo por individuo en el cerdo, formando grupos de muestra de hasta 100 animales. En el caso del cerdo, la sensibilidad de la prueba ha sido determinada infiriendo que a partir de una muestra de 1 gr es capaz de detectar infecciones con cargas parasitarias ≥ 3 larvas por gramo de tejido (Lpg); en una muestra de 3 gr se detectarán infecciones con cargas parasitarias $\geq 1,5$ Lpg y finalmente, en una muestra de 5 gr se detectarán infecciones ≥ 1 Lpg (Gamble y col. 2000). Para estudios epidemiológicos de animales reservorios (animales silvestres u otros), se recomienda que se ajuste el tamaño de la muestra para obtener una sensibilidad de 1Lpg ya que

en estos animales la intensidad de la infección suele ser muy baja (Gamble y col., 2000).

Por otra parte, las técnicas de digestión artificial cumplen todos los requerimientos de eficacia, costo-beneficio y sensibilidad. En estas, las larvas musculares son liberadas luego de la digestión del tejido muscular por medio de una solución de digestión artificial compuesta por 1% de pepsina (1:10.000 NF) y un 1% de ácido clorhídrico (HCl), seguido de procedimientos de filtración y sedimentación selectivos que permiten recuperar las larvas que son finalmente vistas al microscopio (Gottstein y col., 2009).

- La triquinoscopia es un método simple y que no requiere grandes implementos para realizarla. El triquinoscopio o método de compresión se realiza utilizando una muy pequeña muestra de músculo (28 piezas de éstas corresponden a 1 gr de músculo) que son comprimidas entre dos placas de vidrio hasta que la muestra se vuelve translúcida y son examinadas individualmente buscando la presencia de larvas de *Trichinella* utilizando un microscopio a 15-40x.

La triconoscopia es un método laborioso y consume demasiado tiempo como para utilizarlo en la inspección de carcasas. Además, posee menor sensibilidad que la digestión artificial. Por todas estas razones su uso ha decaído (Gajahdar y col. 2009).

4.4.2. Técnicas moleculares

Para la realización de estudios epidemiológicos y mejora de los conocimientos en la ocurrencia y dispersión de *Trichinella* spp. en los animales domésticos y silvestres, todos los aislamientos deben ser identificados con la especie o genotipo de que se trate. Ya que no hay diferencias morfológicas para poder identificarlas los diagnósticos moleculares son utilizados para lograrlo. Se ha desarrollado una técnica de PCR capaz de realizar de forma simple y segura la diferenciación de especies y genotipos. Esta técnica además es sensible, económica y rápida permitiendo obtener resultados altamente específicos (Gottstein y col., 2009).

4.4.3. Técnicas serológicas

Estas técnicas permiten la detección de anticuerpos específicos para *Trichinella* en suero y fluidos celulares colectados antes o después del sacrificio del animal. Su uso aún no puede ser realizado en la inspección de carne, pero cumple grandes propósitos en el control de la infección y estudios epidemiológicos en las poblaciones animales. El ELISA es rápido y es el método serológico más usado en cerdos y jabalíes, puede ser rápidamente estandarizado y automatizado.

El ELISA tiene la ventaja de ser más sensible que los métodos de digestión en animales con bajas cargas parasitarias, esta sensibilidad es muy útil para detectar posibles transmisiones a nivel de granjas. Esta técnica ha llegado a detectar infecciones de menos de 1Lpg. De todos modos, la sensibilidad del ELISA es altamente dependiente de la calidad del antígeno usado en la prueba y también la procedencia y la especie con que se esté trabajando.

La principal desventaja que presenta este método es que el “período ventana” del mismo sobre pasa algunas semanas después de que la larva se vuelve infectiva en el músculo, dando falsos negativos (Gajadhar y col., 2009).

4.5. Métodos de procesamiento de la carne post faena.

Hay medidas a tomar para eliminar el riesgo de adquirir la enfermedad cuando la carne a consumir no ha sido testeada y hay incertidumbre de su seguridad para el consumo.

La ICT y muchas otras autoridades recomiendan que la carne fresca de cerdo sea preparada en horno convencional, alcanzando una temperatura interna de 71°C, ya que la cocción en microondas no calienta uniformemente o por tiempo suficiente como para destruir la *Trichinella*.

Otra forma matar a la *Trichinella spiralis* (recordar que esta misma en carne de caballo es resistente a la congelación y otras especies también lo son, Tabla 2.) en carne de cerdo puede ser congelándola. Para que esto suceda debe ser congelada durante 20 días a -15°C, 10 días a -23°C o 6 días a -29°C, en trazos de carne con un grosor menor a 15 cm.

Los procesamientos de curado para la mayoría de los productos del cerdo también están especificados. De todas formas, la efectividad del curado depende en un muy controlado monitoreo de la concentración de sal, temperatura y tiempo. Por esta razón la ICT no considera el uso del curado como una técnica segura.

Finalmente, si bien métodos de irradiación han sido aprobados por ciertas jurisdicciones, puede que pase algún tiempo antes de que la carne irradiada de cerdo se convierta ampliamente aceptada o disponible para los consumidores (Gajahdar y col., 2009).

4.6. La triquinelosis en el hombre

Siguiendo reportes de 55 países donde la triquinelosis ocurre autóctonamente, los casos anuales de la enfermedad clínica fueron estimados de ser alrededor de 10.000, con un porcentaje del 0.2% de mortandad (Pozio, 2007).

La infección en humanos está fuertemente asociada a el consumo de carne cruda o insuficientemente cocida, donde el factor cultural (como por ejemplo platos tradicionales) juega un gran papel en la epidemiología.

A pesar de la variedad de hospedadores donde se desarrolla, la carne de cerdo doméstico y sus productos relacionados siguen siendo la más importante fuente de contagio de Triquinelosis en el hombre, especialmente cuando son cerdos criados libremente o de traspatio.

La infección por Triquinela en el hombre puede ser dividida en dos fases: una intestinal y otra muscular. Infecciones con baja intensidad pueden llegar a mantenerse asintomáticas, pero cuando la dosis infectiva supera algunos cientos de larvas puede darse inicialmente una gastroenteritis con diarrea y dolores abdominales aproximadamente 2 días post infección.

Las larvas migrantes y sus metabolitos provocan una reacción inmediata del sistema inmune. En este contexto, es que se presenta la eosinofilia característica, aunque la intensidad y dinámica de la misma depende de la dosis de larvas, las especies de *Trichinella* involucradas, la susceptibilidad del paciente a la infección, así como también el tiempo desde el comienzo del tratamiento. Estas reacciones inmunológicas son las causantes de los síntomas como ser el edema (que se da principalmente alrededor de los ojos), vasculitis y la producción de finos trombos intravasculares.

En los comienzos de las manifestaciones clínicas de la enfermedad los síntomas son muy inespecíficos como malestares, dolor de cabeza, fiebre, fiebre asociada a escalofríos y ocasionalmente síntomas gastrointestinales. La fiebre usualmente persiste por 1 a 3 semanas, dependiendo de la dosis infectiva y la severidad de la enfermedad. Las figuras clínicas más representativas de la primera etapa de la enfermedad son el aumento de temperatura, edema peri-orbital o facial, dolor muscular como síntomas principales, ocasionalmente se puede llegar a complicar con miocarditis, enfermedad trombótica y encefalitis. Por todas estas razones su diagnóstico clínico es muy difícil de realizar.

El diagnóstico de laboratorio generalmente se realiza mediante la biopsia de músculo de paciente o mediante la técnica de ELISA, aunque también se puede realizar mediante la detección de larvas por técnicas de laboratorio anteriormente descritas en productos alimenticios que hayan sido consumidos por el involucrado.

A partir de un diagnóstico adecuado, el tratamiento debe ser instaurado lo más rápidamente posible, este incluye drogas como antihelmínticos (Albendazole), glucocorticoides y soluciones para compensar las pérdidas proteínicas y electrolíticas (Gottstein y col., 2009).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

- Iniciar una línea de trabajo en *Trichinella spirallis* en DILAVE Uruguay.

5.2. Objetivos específicos

- Poner a punto la técnica de Digestión Artificial para el diagnóstico de *Trichinella spirallis* en el laboratorio DILAVE.
- Ensayar la técnica en muestras de especies de mayor susceptibilidad a la enfermedad existentes en Uruguay debido a que las mismas presentan digestibilidades diferentes.
- Mantener larvas de *Trichinella spirallis* en el laboratorio DILAVE considerando que sería necesario continuar profundizando en la materia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental fue realizado en el Laboratorio de la Sección de Endoparásitos del Departamento de Parasitología perteneciente a la DILAVE, MGAP, “Miguel C. Rubino” km 17 Ruta 8 Montevideo, Uruguay.

Para una mayor comprensión de este trabajo, se detalla a continuación la cronología de las actividades realizadas:

- Digestión Artificial (DA) de Kits de pro-eficiencia M y N provenientes de Laboratorio en Canadá.
- Infección de 6 ratones.
- DA de muestras de Jabalíes.
- Elaboración y DA de muestras de pro-eficiencia propias.
- DA de Kits de pro-eficiencia A y B provenientes de Laboratorio en Canadá.
- DA de Kits de pro-eficiencia W y X provenientes de Laboratorio en Canadá.
- Infección de 4 ratones.
- DA de muestras de Equinos.
- DA de muestras de Cerdos.

6.1. Puesta a punto de la Técnica de DA

Para lograr este objetivo se trabajó con kits de muestras de pro-eficiencia proporcionados por el Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico Veterinario del Centro de Parasitología Alimentaria y Animal, perteneciente a la Agencia Canadiense de Inspección de alimentos en Saskatoon, el cual es Laboratorio de referencia mundial de OIE para *Trichinella* (Gajadhar y col., 2009).

6.1.1. Descripción del Material Biológico

Se procesaron en total 6 kits de muestras de pro-eficiencia, cada uno de los cuales estaba conformado por 3 muestras positivas y una muestra negativa (control). Las muestras consistían en 20 gr de carne picada de cerdo conteniendo en su interior un pequeño disco de agar sosteniendo una cantidad conocida de quistes de larvas de *Trichinella spirallis*.

Los kits fueron enviados en tres instancias distintas. Primero se recibieron dos lotes identificados con las letras M y N, cada uno conteniendo cuatro muestras que estaban identificadas con la letra del kit al cual correspondían y un número (M1, M2, M3 y M4) y (N1, N2, N3 y N4). En una segunda instancia se recibieron los kits identificados como A (A1, A2, A3 y A4) y B (B1, B2, B3 y B4) y finalmente los kits W (W1, W2, W3 y W4) y X (X1, X2, X3 y X4).

6.1.2. Digestión Artificial (ANEXO I)

El procedimiento que se realizó para la digestión de muestras tiene como base teórica la técnica **“The Double Separatory Funnel Digestion Procedure for the Detection of *Trichinella Larvae in Pork*”** desarrollada y patentada por la Agencia Canadiense de Inspección de

alimentos en Saskatoon. Este material no se encuentra en referencias bibliográficas ya que se trata de un documento privado.

Se digirieron los 20gr de cada muestra de pro-eficiencia de forma individual utilizando para cada un 600 ml de solución artificial de digestión, la cual consistía en un 1% de pepsina (1:10.000 NF) y un 1% de Ácido Clorhídrico. La digestión se realizó durante 30 minutos o más a $44^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ dentro de un Vaso de Bohemia de 500 ml que contenía la solución de digestión, sobre una platina caliente con agitador magnético. Luego de finalizada la digestión se filtraba dicha solución por un filtro de 178μ hacia una bola de decantación de 1000ml., dejándose reposar 30 minutos sin disturbios. Cumplido el tiempo se pasaban 25 ml. de sedimento a una bola de decantación de 500ml. que se encontraba debajo de la anterior y se esperaban 10 minutos. Luego se pasaban 25 ml. de sedimento a una caja de Petri con fondo cuadrículado, esperando 1 minuto y observando en lupa binocular a 10X o más.

Los procedimientos de desinfección que se realizaron dependían del resultado de la muestra (para mayor detalle dirigirse al ANEXO I).

6.1.3. Criterio de Evaluación de los resultados (muestras de pro-eficiencia) (ICT Quality Assurance Committee, 2012b).

Para que los resultados se consideraran Aceptables se debían cumplir cada uno de los siguientes criterios:

- Muestras positivas: cuando las muestras contenían de 3-5 larvas se debía recuperar al menos una larva. Cuando las muestras contenían un número mayor a 5 se debía recuperar al menos el 75% de las larvas. Si el 75% mínimo no era un número entero el número se redondeaba hacia abajo hasta el próximo número entero. Por ejemplo, si el total de larvas en la muestra eran 6, el 75% son 4,5. Como no se puede recuperar 0,5 larvas el número de aceptación pasa a ser 4 larvas.
- Muestras negativas: las muestras negativas debían ser correctamente identificadas (no recuperar ninguna larva).

6.2. Obtención y procesamiento de muestras de campo

6.2.1. Muestras de Jabalíes

Se obtuvieron 156 muestras de músculo diafragma de Jabalíes que fueron provistas por el equipo de trabajo MGAP-UDELAR en el marco de un sistema de vigilancia sistemático. Estas muestras fueron colectadas en un evento de caza (Fiesta del Jabalí en Aiguá, Maldonado, Uruguay) (Castro y col., 2015).

Cabe destacar que las muestras habían sido congeladas antes de que se entregaran al laboratorio y debido a las limitaciones en materiales y equipos con los cuales se contaban al momento no fue posible armar grupos de muestras con una cantidad significativa de gramos de cada muestra individual según especifica y recomienda la ICT (ICT Quality Assurance Committee, 2012a).

Tabla 3. Grupos de muestras de Jabalíes.

Grupos de muestras	Cantidad de muestra por animal (gr)	Cantidad de animales	Total procesado (gr)
DigJ1	5	4	20
DigJ2	5	4	20
DigJ3	5	4	20
DigJ4	5	4	20
DigJ5	1	20	20
DigJ6	1	20	20
DigJ7	1	20	20
DigJ8	1	20	20
DigJ9	1	20	20
DigJ10	1	20	20
DigJ11	1	20	20

Se digirieron los 20gr de los que constaban cada uno de los grupos de muestras de forma individual.

6.2.2. Muestras de Equinos

Se obtuvieron muestras de 10 equinos a partir de visita a planta de Frigorífico SAREL, ubicada en la Ruta 7, km 28.600, Sauce, Canelones, Uruguay.

Se nos proporcionaron músculos maceteros de 10 animales, los cuales fueron empacutados al vacío en planta y acondicionados en conservadora con refrigerante transportándose así al laboratorio el día mismo en que se obtuvieron donde se colocaron en refrigerador manteniendo una temperatura entre los 2 y 8°C hasta el momento de su procesamiento.

Las muestras de 20 gr fueron procesadas a los 5 días de obtenidas formando grupos de muestras de la siguiente forma:

Tabla 4. Grupos de muestras de equinos.

Grupos de muestras	Cantidad de muestra por animal (gr)	Cantidad de animales	Total procesado (gr)
DigE1	5	4	20
DigE2	5	4	20
DigE3	10	2	20

6.2.3. Muestras de Cerdos

Se obtienen muestras de cerdos gordos pertenecientes a Granja La Familia que fueron recolectados en la planta Frigorífica perteneciente a MIRNABEL S.A. ubicada en Ruta 75, km 36.500, Pando, Canelones, Uruguay.

Las muestras fueron extraídas de los músculos que conforman los pilares del diafragma en el momento de la faena por un operario de la planta y se colocaron en bolsas plásticas individuales dentro de una conservadora con refrigerante. Se muestrearon 30 animales de un lote de 72 individuos.

Del material colectado se procesaron 20 gr el mismo día de la colecta formando grupos de muestras de la siguiente forma:

Tabla 5. Grupos de muestras de cerdos.

Grupos de muestras	de	Cantidad de muestra por animal (gr)	Cantidad animales	Total procesado (gr)
DigC1	2		10	20
DigC2	2		10	20
DigC3	2		10	20

6.3. Infección experimental de ratones y elaboración de muestras de pro-eficiencia

6.3.1 Infección de ratones (*Mus musculus*)

El Laboratorio Canadiense de referencia para la OIE envió junto con los dos primeros Kits de muestras de pro-eficiencia, músculo de rata infectada con larvas de *Trichinella* con el cual se realizó la infección de ratones y a partir del sacrificio de los mismos se elaboraron muestras de pro-eficiencia propias.

Por esta razón ingresaron al Laboratorio de Parasitología del DILAVE 6 ratones hembras (*Mus musculus*) CD1 stock de 6 semanas de edad que tenían como origen el bioterio de la misma institución. Los ratones fueron mantenidos en jaulas separadas con cama a base de viruta que era cambiada dos veces por semana. Eran dos jaulas en las que se colocaron 3 animales respectivamente. Se les administraba agua y comida *ad libitum* proporcionada por el bioterio.

Se digirieron los 10gr de músculo de rata con 650Lpg (Larvas por gramo) en 300 ml. de solución artificial de digestión la cual consistía en un 1% de pepsina (1:10.000 NF) y un 1% de Ácido Clorhídrico, después de realizada correctamente la DA, se recogió el sedimento de la última en cajas de Petri que se llevaron a la Lupa Binocular, donde con ayuda de una micropipeta de 20µl se armaron las dosis recogiendo las larvas y poniéndolas en un tubo Eppendorf. Se armaron tres dosis de 100 Larvas y tres dosis de 200 Larvas respectivamente.

Una vez que las 6 dosis estuvieron armadas se dejaron sedimentar por 5 minutos, luego se retiró el sobrenadante y se dosificaron, vía oral, los ratones mediante el uso de una jeringa de insulina a la cual se le colocó un tubo de hematocrito en el extremo anterior. Los ratones se siguieron manteniendo separados en dos grupos de tres, por un lado, los infectados con 100 larvas y por otro los infectados con dosis de 200.

Para la realización de la infección de los ratones se utilizó información proporcionada por el Dr. Brad Scandrett (trabajaba en el CFAP y formaba parte de la ICT) y la Dra. Florencia Bono (trabajaba en Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral Este en Esperanza, Santa Fé, Argentina) quienes transmitieron su experiencia mediante comunicaciones personales; así como también de estudios experimentales como ser el de Meagher y Dudek, 2002.

6.3.2. Elaboración de muestras de pro-eficiencia (ANEXO II)

Se elaboraron un total de 32 muestras de pro-eficiencia positivas y una muestra negativa que fueron realizadas en diferentes oportunidades a partir del sacrificio de 3 ratones infectados (dos con una dosis de 100 larvas y otro con una dosis de 200 larvas) siguiendo la metodología descrita en el trabajo experimental realizado por Forbes y col. en 1998.

Se comienza armando el kit I, formado por tres muestras positivas (con 10, 10 y 7 quistes de larva respectivamente) y una muestra negativa (0 quiste). Luego de lo cual se realizó la DA individual de cada una de las muestras que integraban el kit (ANEXO I).

Luego se elaboraron 18 muestras positivas identificadas con la letra J. Las cantidades de quistes de larvas que se colocaron dentro de estas muestras variaban en un rango entre 3 y 28. De este lote sólo se digirieron 5 muestras de las cuales 4 eran las que tenían la mayor cantidad de quistes (28, 15, 19 y 16 quistes larvados respectivamente) y una muestra que contenía tan sólo 4 quistes.

A continuación, se elaboraron 4 muestras positivas identificadas como Q con 25, 30, 35 y 40 quistes de larvas, posteriormente se les realizó DA a las 4.

Y finalmente, en un último intento se elaboraron 7 muestras positivas más (4 muestras conteniendo 5 quistes y 3 conteniendo 9 quistes) de las cuales sólo se procesó una con 9 quistes.

Debido a que los resultados que obteníamos de las digestiones de las muestras de pro-eficiencia elaboradas en el DILAVE no eran los esperados, se decidió pedir nuevamente kits de muestras de pro-eficiencia canadienses (kits A y B).

Tiempo después se piden los últimos dos kits elaborados en Canadá (W y X), que además vinieron acompañados con músculo de rata infectado con el cual se infectaron 4 ratones con dosis de 150 larvas cada uno, a partir de los cuales no se hizo ningún experimento más.

7. RESULTADOS

7.1. Muestras de pro-eficiencia CFAP

7.1.1. Primer Instancia

Tabla 6. Resultados de muestras del Kit M.

Identificación de la muestra	N° de larvas recuperadas	Cantidad real	Porcentaje de recuperación (%)
M1	9	13	69,2
M2	0	6	0
M3	6	18	33,3
M4	0	0	
Total	15	37	40,5

Como podemos apreciar en la Tabla 6., el resultado de la muestra M2 fue falso Negativo, mientras que la muestra Control o Negativa (M4) fue correctamente identificada.

Tabla 7. Resultados de muestras del Kit N.

Identificación de la muestra	N° de larvas recuperadas	Cantidad real	Porcentaje de recuperación (%)
N1	2	18	11,1
N2	4	11	36,4
N3	2	7	28,6
N4	0	0	
Total	8	36	22,2

No se presentan resultados falsos Negativos, la muestra Control o Negativa (N4) fue correctamente identificada (Tabla 7). En ninguno de los dos kits (M y N) fueron alcanzados los requerimientos de Aceptación de resultados (Tabla 6 y 7).

7.1.2. Segunda Instancia

Debido a un problema técnico evidenciado en el procesamiento del Kit A nuestros resultados no fueron pasados al CFAP, por lo cual se desconoce la cantidad real de larvas que se encontraban dentro de las muestras. Esto llevó a que los resultados del procesamiento de las muestras de este kit no se tomaran en consideración en el análisis de los resultados.

Tabla 8. Resultados de muestras del Kit B.

Identificación de la muestra	N° de larvas recuperadas	Cantidad real	Porcentaje de recuperación (%)
B1	3	6	50
B2	9	12	75
B3	13	18	72,2*
B4	0	0	
Total	25	36	69,4

(*) Aceptable por redondeo.

Como se puede ver en la Tabla 8., en el kit B de muestras no se registraron falsos negativos y la muestra Control Negativo (B4) fue identificada correctamente. No se alcanzaron los requerimientos establecidos en la muestra B1, lo cual no es aceptable.

7.1.3. Tercer Instancia

Tabla 9. Resultados de muestras del Kit W.

Identificación de la muestra	N° de larvas recuperadas	Cantidad real	Porcentaje de recuperación (%)
W1	10	12	83,3
W2	3	3	100
W3	0	0	
W4	4	6	66,6*
Total	17	21	80,9

(*) Aceptable por redondeo.

Tabla 10. Resultados de muestras del Kit X.

Identificación de la muestra	N° de larvas recuperadas	Cantidad real	Porcentaje de recuperación (%)
X1	0	0	
X2	9	10	90
X3	2	3	66,7*
X4	3	5	60*
Total	14	18	77,8

(*) En muestras de 3-5 una recuperación ≥ 1 es aceptable.

Los resultados de ambos kits W y X, cumplen con los criterios de Aceptación para los resultados de las muestras de pro-eficiencia. No se registraron falsos Negativos y las muestras Control Negativo W3 y X1 fueron correctamente identificadas. Todo esto puede ser evidenciado en las Tablas 9 y 10.

7.2. Muestras de campo

En ninguna lectura de resultados fue necesario realizar clarificación, y sólo al grupo DigC3 (grupo de muestras de cerdos) hubo que dejarlo 5 minutos más para que se completara la digestión.

7.2.1. Muestras de Jabalíes

El resultado de la DA de los 11 grupos de muestras de Jabalíes a partir de las muestras de 156 individuos fue Negativo (no se visualizaron larvas).

7.2.2. Muestras de Equinos

El resultado de la DA de los 3 grupos de muestras de Equinos a partir de las muestras de 10 individuos fue Negativo (no se visualizaron larvas).

7.2.3. Muestras de Cerdos

El resultado de la DA de los 3 grupos de muestras de Cerdos a partir de las muestras de 30 individuos fue Negativo (no se visualizaron larvas).

7.3. Infección de ratones y muestras de pro-eficiencia DILAVE

7.3.1. Infecciones de ratones

De todos los animales que fueron sacrificados se recuperaron larvas. Aunque no se realizó una determinación numérica, a simple vista podía evidenciar que la concentración de larvas que se recuperaron del animal que había sido infectado con una dosis de 200 larvas era mayor.

7.3.2. Muestras de pro-eficiencia DILAVE

Sólo se recuperaron larvas de dos digestiones de las 13 que se realizaron de muestras de pro-eficiencia positivas (Tabla 11). Además, la recuperación fue muy baja.

Tabla 11. Resultados Positivos de las muestras de pro-eficiencia elaboradas.

Identificación de la muestra	Resultado digestión	Resultado Real
J15	2	19
J16	1	15

8. DISCUSIÓN

Nuestro país es miembro de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) y tiene como tal, el compromiso de declarar las enfermedades de los animales que detecta en su territorio. Para ello debe llevar una vigilancia sanitaria sobre las enfermedades más importantes en cuanto a salud humana, animal y relevancia económica. Esto no sería posible si no contáramos con buenas técnicas diagnósticas y personal capacitado para la realización e interpretación de las mismas.

En el caso particular de *Trichinella spiralis*, enfermedad que forma parte de la lista de enfermedades de denuncia obligatoria de la OIE, la importancia de contar con un buen método diagnóstico radica además en que el diagnóstico clínico es muy difícil de realizar ya que los síntomas en los animales son bastante inespecíficos y difíciles de detectar (Gottstein y col., 2009), por tanto, debemos apoyarnos fundamentalmente en el laboratorio.

Si comparamos los diferentes métodos de diagnóstico disponibles podemos evidenciar las diferencias de los mismos frente a la Técnica de Digestión Artificial. La Triquinoscopia es una técnica poco sensible ya que no realiza ningún enriquecimiento de la muestra y además su implementación es muy laboriosa lo cual ha llevado a su desuso. La técnica de PCR es una técnica muy sensible pero bastante más costosa que la digestión artificial. Y en cuanto a los métodos serológicos, la técnica más comúnmente usada dentro de los mismos es el ELISA, teniendo como principal desventaja la presencia de falsos negativos durante los primeros estadios de la infección (Gajadhar y col., 2009; Gottstein y col. 2009).

Si bien es cierto que la Digestión Artificial también tiene un “período ventana”, este es menor que el de ELISA. Mientras que la Digestión Artificial es capaz de identificar la infección a partir del día 17 post infección (momento en el cual la *Trichinella* se convierte en infectiva en el músculo), la técnica de ELISA comienza a detectar la infección semanas más tarde dependiendo también de cuan intensa sea la infección (a menor carga parasitaria mayor período ventana). Por otro lado, también podemos decir que el Laboratorio de referencia para la OIE (Canadá) ha evaluado kits de algunos proveedores usando sus propios controles, así como sus propias muestras de animales experimentalmente infectados (cerdos) y muestras de campo. Todos los kits se comportaron razonablemente bien en sueros de animales infectados experimentalmente, pero en las muestras de campo dieron resultados inconsistentes. Cuando ellos produjeron sus propios antígenos para el ELISA los resultados no fueron mucho mejores (comunicación personal, Brad Scandrett, CFAP).

A pesar de tener los inconvenientes de ser una técnica de diagnóstico post mortem y ser realizada utilizando grupos de muestras (pools) lo que implica tener que reevaluar todas las muestras pertenecientes al grupo en forma individual en caso de obtener resultados positivos, la Digestión artificial es la técnica recomendada por la OIE, implementada por la UE y la que se eligió como objetivo de este trabajo considerando que sería fundamental contar con una herramienta diagnóstica que pudiera ser utilizada posteriormente en nuestro país.

Fue así como se realizó el contacto con el CFAP en Canadá. Su pronta respuesta y envío de materiales en la primera instancia, no permitió que se estuviera a un nivel de profundización en el estudio del tema ni de requerimientos de equipo y materiales necesarios

para el correcto desempeño de la técnica. Una de las grandes carencias que se tuvo en ese momento fue la falta de disponibilidad de una pepsina acorde a los estándares requeridos. Esto podría haber resultado en una disminución de su actividad (ICT Quality Assurance Committee, 2012a; Gamble y col., 2000).

Posteriormente, si bien se logró obtener pepsina nueva y en cantidades suficientes, en el procesamiento de las muestras del Kit A se evidenció un problema con la concentración del HCl debido a un error de cálculo.

Luego de haberse logrado corregir la concentración de HCl al momento de procesar las muestras del Kit B, los resultados obtenidos en porcentaje de recuperación de larvas muestran una marcada mejora con respecto a los resultados de la primera instancia (Kit B 69,4% en relación al Kit M 40,5% y Kit N 22,2%). Si bien se logró esa mejoría, los resultados no fueron lo suficientemente buenos como para que fueran aceptables. Se cree que detalles en el equipo y materiales con los que se contaban al momento llevaron a una recuperación insuficiente de larvas, más allá de la falta de experiencia en la técnica. Por ejemplo, hasta ese momento el triturado y homogenización de la muestra se realizaba con una licuadora cuya capacidad era mucho mayor con respecto al volumen que se manejaba de solución total de digestión por muestra y la disposición en la que se encontraba su cuchilla hacía que la solución salpicara mucho. Todo esto se considera que podía derivar a un área de superficie muy grande en el cual las larvas podían llegar a quedar adheridas.

A causa de todo lo anteriormente descrito fue que antes de la tercera instancia de procesamiento de muestras de pro-eficiencia se realizaron los cambios en el equipo que se pensó se adaptarían mejor a la capacidad de procesamiento de muestras con la que se contaba. Fue así que se adquirió un mixer Philips modelo Hr1600 para intentar disminuir de este modo las posibilidades de perder larvas en la instancia de triturado y la homogenización de la muestra. También se elaboraron tamices de PVC que se adaptaban mejor a nuestro procedimiento de limpieza (inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 5-6%), ya que este resultó ser muy abrasivo para los tamices con los que se contaban hasta el momento. Además de los cambios de equipos y materiales, se realizó un profundo estudio en los puntos críticos de control de la técnica y las medidas que se deben de tomar para el aseguramiento de la calidad de la misma. Las guías desarrolladas por la Comisión de Aseguramiento de la calidad de la ICT fueron los manuales indispensables para lograr alcanzar lo anteriormente dicho (ICT Quality Assurance Committee 2012a y 2012b).

Es así que se llega a la tercera instancia no sólo con una mayor experiencia, sino también con un nivel de preparación y cumplimiento de los requerimientos necesarios para el buen desarrollo de la técnica, sustancialmente mayores que en las dos instancias anteriores. Por todo esto se cree que los resultados obtenidos en la tercera instancia alcanzaron los requerimientos necesarios para la aceptación de los mismos. El trabajo desarrollado por Marucci y col. en 2016 donde se evalúa la capacidad de los analistas de varios laboratorios que desempeñan la técnica en la UE durante un período 9 años (2007-2015) se considera que es una referencia significativa de las afirmaciones realizadas en este aspecto. En él se evidencia la evolución de los analistas mediante el desempeño de digestiones de Kits de pro-eficiencia, donde al inicio en 2007 sólo el 83,3% de los analistas alcanzaban el 75% de recuperación de larvas de los mismos y al final, en el 2015, el 100% de los analistas eran

capaces de obtener los resultados requeridos. A su vez, este trabajo coincide con el realizado por Forbes y col. en 1998 donde afirman que el empleo de Kits de pro-eficiencia para asegurar la calidad de la técnica permite a los operarios obtener resultados acordes en un corto período de entrenamiento, obteniendo los mismos resultados que analistas experimentados.

Los resultados obtenidos en las muestras de campo, infección de ratones y elaboración de muestras de pro-eficiencia propias, se considera que no tienen gran significancia en el cumplimiento del objetivo principal de este trabajo el cual es, la Puesta a Punto de la Técnica de Digestión Artificial para el diagnóstico de *Trichinella spiralis*. Si bien fueron parte de este nuevo emprendimiento y su realización fue enriquecedora a nivel de adquisición de nuevos conocimientos en la materia en nuestro país, se cree que su implementación hubiera tenido mayor implicancia si se hubieran realizado luego de haber alcanzado los requerimientos aceptables en el procesado de las muestras de pro-eficiencia canadienses (tal es el caso de las muestras de Jabalí y digestión de muestras de pro-eficiencia propias) y si se hubieran procesado una mayor cantidad de muestras que fueran realmente significativas (muestras de cerdos y equinos) dirigidas hacia un relevamiento epidemiológico de verdadera significancia.

Desde el comienzo de este trabajo todo formó parte de un nuevo aprendizaje. Empezando, por los requerimientos para la importación del material biológico los cuales incluyen, la autorización del ente de contralor en esta materia (en nuestro caso la DILAVE-MGAP), el uso de una empresa certificada para el transporte del material y procedimientos para la liberación del mismo por aduana. Pasando por la obtención de equipos, materiales y reactivos que cumplieran con los requerimientos mínimos para la implementación de la técnica, hasta llegar a la profundización de los puntos Críticos de Control de la Técnica para de ese modo mejorar los resultados. Queriendo remarcar finalmente con esto, lo laborioso de lograr poner toda esta maquinaria en marcha y todo el camino que se tuvo que transitar para llegar al punto en el que nos encontramos hoy.

9. CONCLUSIONES

La evolución de la experiencia y los conocimientos adquiridos a lo largo de este trabajo permitieron llegar finalmente a la adquisición de resultados que cumplen con los criterios de aceptación para la implementación de la Técnica de Digestión Artificial para el Diagnóstico de *Trichinella spiralis* en diferentes especies animales.

Es a partir de aquí que se considera que de ahora en más se podrían extender los conocimientos en esta materia en nuestro país, como ser la posibilidad de elaborar kits de diagnóstico utilizando larvas de *Tichinella spiralis* inactivadas (Mayer-Scholl y col., 2013) para el apoyo de laboratorios particulares que deben realizar la técnica por exigencias en el comercio o realizar estudios epidemiológicos que fundamenten y avalen el estado sanitario de nuestro país con respecto a la Triquinelosis.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1- **Andrade; Rodríguez, E (1911)** *Trichina spiralis* Owen. Revista de Medicina Veterinaria de la Escuela de Montevideo, 2 (8-9): 376-377.
- 2- **Castro, G.; Lozano, A.; Castro Ramos, M.; Días, L.; Chans, L.; Arbiza, J.; Verger, L.; Mirazo, S.; Acheriteguy, A.; Fernández, E.; Ramos, N. (2015)** Vigilancia sanitaria en jabalíes y cerdos asilvestrados en Uruguay. En: Lombardi R, Geymonat G, Berrini R. El Jabalí en el Uruguay. Problema, desafío y oportunidad. Montevideo, Forestal Atlántico Sur, pp 60-69.
- 3- **European Union (2015)** Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls of *Trichinella* in meat. Official Journal of the European Union, 212: 7-34.
- 4- **Forbes, L.B.; Rajic, A.; Gajadhar, A.A. (1998)** Proficiency Samples for Quality Assurance in *Trichinella* Digestion Tests. Journal of Food Protection, 61 (10): 1396-1399.
- 5- **Gajahdar, A.A.; Pozio, E.; Gamble, H.R.; Nöckler, K.; Maddox-Hyttel, C.; Forbes, L.B.; Vallé, I.; Rossi, P.; Marinculic, A.; Boireau, P. (2009)** *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety. Veterinary Parasitology, 159: 197-205.
- 6- **Gamble H.R., Bessonov A.S., Cuperlovic K., Gajadhar A.A., van Knapen F., Nöeckler K., Schenone H., Zhu X. (2000)** International Commission on Trichinellosis: recomendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. Veterinary Parasitology 93: 393-408.
- 7- **Gottstein, B.; Pozio, E.; Nöckler, K. (2009)** Epidemiology, Diagnosis, Treatment and control of Trichinellosis. Clinical Microbiology Reviews, 22 (1): 127-145.
- 8- **ICT Quality Assurance Committe (2012a)** Recommendations for Quality Assurance in Digestion Testing Programs for *Trichinella*, Essential quality assurance standards for *Trichinella* digestion assays, 13p. Disponible en: http://www.trichinellosis.org/uploads/Part_2_final_-_Digestion_assasy_final_7Feb2012.pdf. Fecha de consulta: 22/11/2017.
- 9- **ICT Quality Assurance Committee (2012b)** Recommendations for Quality Assurance in Digestion Testing Programs for *Trichinella*, Recommendations for Quality Assurance in Proficiency Testing, 9p. Disponible en: http://www.trichinellosis.org/uploads/PART_3_final_-_PT_7Feb2012.pdf Fecha de consulta: 22/11/2017.
- 10- **INAC (2017)** Empresas Exportadoras del Sector Cárnico. Disponible en: <http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/10676/1/lista-completa---empresas-exportadoras-de-sector-carnico.pdf>. Fecha de consulta: 19/11/17
- 11- **López Lindner, J. (1922)** Contribución al estudio de la Triquinosis (Ampliación). Revista de Medicina Veterinaria de la Escuela de Montevideo, 5 (20): 1-6.
- 12- **Marucci, G.; Tonanzi, D.; Cherchis.; Galati, F.; Bella, A.; Intersiano, M.; Ludovisi, A.; Amati, A.; Pozio, E. (2016)** Proficiency testing to detect *Trichinella* larvae in meat in the European Union. Veterinary Parasitology, 231: 145-149.
- 13- **Martínez, A.R. (2002)** Triquinelosis. En: Cordero del Campillo y otros. Parasitología Veterinaria. 3ª ed. Madrid, MacGraw-Hill – Interamericana. 968 p.
- 14- **Mayer-Scholl, A.; Reckinger, S.; Nöckler, K. (2013)** A study on the suitability of inactivated *Trichinella spiralis* larvae for proficiency samples. Veterinary Parasitology, 194: 113-116.

- 15- **Meagher S., Duddek S.N. (2002)** Effects of *Trichinella spirallis* on survival, total mass, and organ mass of oldfield mice (*Peromyscus polionotus*). *Journal of Parasitology*, 85(5): 833-838.
- 16- **Murrell, K.D., Pozio, E. (2011)** Worldwide occurrence and impact of human Trichinellosis, 1986-2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12): 2194-2202.
- 17- **Nöckler, K.; Kapel, C.M.O. (2007)** Detection and Surveillance for *Trichinella*: Meat Inspection and Hygiene, and Legislation. En: Dupouy-Camet J and Murrell KD (Eds.) *FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of Trichinellosis*. Roma, pp 69-98. Disponible en: http://www.trichinellosis.org/uploads/FAO-WHO-OIE_Guidelines.pdf. Fecha de consulta: 18/11/17.
- 18- **Pozio, E. (2014)** Searching for *Trichinella*: not all pigs are created equal. *Trends in Parasitology*, 30: 4-11.
- 19- **Pozio, E. (2007)** World distribution of *Trichinella* spp infections in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 149: 3-21.
- 20- **Salsamendi, R.C. y Bertullo, V.H. (1945)** La Triquinosis del cerdo en el Uruguay. *Revista de Medicina y Veterinaria de la Escuela de Montevideo*, 22(41): 561 – 571.
- 21- **Steffan, P. (2006)** Trichinellosis en el cono sur de América: situación actual y prospectiva de una zoonosis parasitaria ancestral. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_cerdos/01-trichinellosis.pdf Fecha de consulta: 26/11/2017.
- 22- **Talice, R.V. y Fiandra, O.A. (1943)** Primeros hallazgos en el Uruguay de triquinas en cadáveres humanos. Apartado de los Archivos Uruguayos de Medicina Cirugía y Especialidades, 23(6): 521-534.
- 23- **Talice, R.V. (1943)** ¿Constituye la triquinelosis un problema médico – higiénico en el Uruguay? Apartado de los Archivos Uruguayos de Medicina Cirugía y Especialidades, 23(6): 535-553.
- 24- **Wolffhügel, K. (1916)** El primer hallazgo de la Triquina *Trichinella spiralis* (Owen) en Sud América. *Revista de Medicina Veterinaria de la Escuela de Montevideo*, 1 (5): 173-174.
- 25- **Wolffhügel, K. (1919)** Bibliografía sobre la triquina y triquinosis en Sud América. *Revista de Medicina Veterinaria de la Escuela de Montevideo*, 4 (18): 773-795.

PROTOCOLO DE TÉCNICA DE DIGESTIÓN ARTIFICIAL

Este protocolo de Digestión Artificial tiene como base fundamental la técnica “**The Double Separatory Funnel Digestion Procedure for the Detection of *Trichinella* Larvae in Pork**” desarrollada y patentada por el Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico Veterinario del Centro de Parasitología Alimentaria y Animal, perteneciente a la Agencia Canadiense de Inspección de alimentos en Saskatoon.

Todos los operarios que realicen la técnica deben conocer medidas de bioseguridad en laboratorio y usar la protección correcta como túnica de laboratorio, guantes descartables y también en ocasiones, lentes de protección y tapa boca

1. Equipos/Materiales

- Cuchillos o tijeras
- Espátula
- Termómetro (rango de 18-100°C y divisiones de 1,0°C)
- Mixer Philips modelo Hr1600
- Agitador magnético termo regulable – barra magnética
- Vasos de Bohemia o de precipitado de capacidad suficiente para 600 y 300 ml
- Balanza
- Bola de decantación de 1000ml
- Bola de decantación de 500ml
- Soporte de pie con dos brazos
- Embudo de vidrio
- Tamiz de 180µ
- Lupa Binocular
- Guantes descartables
- Cajas de Petri con patrón cuadrículado (regla y aguja)
- Recipiente grande cúbico (inmersión)
- Bidón plástico de 5 L
- Pipeta de vidrio
- Propipeta de goma
- Papel de aluminio
- Papel film
- Nylon
- Algodón

2. Reactivos

- Pepsina 1:10000 NF (1%)
- HCl 37± 1% w/w
- Agua destilada caliente

- Hipoclorito de sodio (5-6% v/v)
- Alcohol etílico (70% v/v)

3. Obtención y procesamiento de muestras de campo

Cuando el material a digerir sean muestras de animales es muy importante tener las siguientes consideraciones. Una cantidad apropiada de muestra de músculo debe ser colectada a partir de un músculo de predilección para la especie a analizar. Las muestras de músculo tomadas de las carcasas de animales deben ser por lo menos dos veces el peso requerido para examinar de forma que permita el recorte de tejidos no digeribles como ser tendones, fascias y grasa (ICT Quality Assurance Committee, 2012a).

Luego de la colecta las muestras deben ser testeadas lo antes posible, de no hacerse lo mismo el material debe ser conservado bajo refrigeración (2-8°C) de forma de enlentecer la descomposición, pero evitar que la muestra se congele. Si un pronto análisis de las muestras no es posible, éstas podrían ser congeladas teniendo en cuenta que el congelamiento puede perjudicar la digestión y puede resultar en una pérdida en la recuperación de larvas que no son resistentes a la congelación; la cantidad de gramos a analizar de estas muestras puede ser aumentado de forma de compensar una disminución en la sensibilidad del test.

Finalmente, es muy importante que el estado de alteración de las muestras al momento de analizar no sea muy avanzado. Muestras que se encuentren totalmente descoloridas, tengan un fuerte olor a putrefacción y sea evidente el comienzo de su descomposición no son aptas para ser analizadas. Además, se debe tratar de evitar procesar muestras que estén congeladas, no vengan en cantidad suficiente, no sean del tejido apropiado o no se encuentren correctamente identificadas.

Tabla 1. Elección de muestra según especie a analizar.

Especie	Músculo de elección	Peso a analizar	Referencias
Cerdo	Diafragma, masetero, lengua.	1-5 gr	Gamble y col 2000.
Caballo	Tejido de lengua o masetero.	mínimo 5 gr para consumo crudo 10 gr	Gamble y col 2000. Gamble y col 2000.
Jabalí	Antebrazo o diafragma. Diafragma, masetero, lengua, intercostal.	mínimo 10 gr 5 gr	Gamble y col 2000. Kapel, 2001.

4. Preparación de Equipos/Materiales y Reactivos

Al inicio se comienza preparando la zona de trabajo de modo de contar con todo el equipo y material necesario a disposición y en condiciones correctas de higiene y desinfección. Se protegen aquellos equipos, como balanza y lupa binocular, que son de uso

conjunto con otros funcionarios del laboratorio y debido a su fragilidad no es posible lavarlos o desinfectarlos con sustancias abrasivas.

Se pesa la cantidad necesaria de pepsina 1:10000 NF (en la solución de digestión debe estar al 1%).

Se preparan cajas de Petri (100 x 15 mm) marcándose un cuadrulado en la parte exterior del fondo utilizando una regla y aguja, de forma que al mirar en la lupa se pueda ver al menos un cuadrado dentro del campo de visión.

Se calcula la cantidad necesaria de solución de Agua y HCl a utilizar (3ml por gr de muestra a procesar), utilizándose siempre agua destilada que se calienta utilizando una Jarra eléctrica a la que se le agregan cantidades necesarias de HCl concentrado al 37% (usando pipeta de vidrio junto con una propipeta para poder enrasar) obteniendo así una solución Agua/HCl al 1%. Esta solución no debe superar los 47°C al momento de usarse, por lo cual antes de hacerlo debe controlarse su temperatura.

5. Limpieza y Desinfección

Debido a que durante la realización del Test (Digestión Artificial) podemos estar trabajando con material infeccioso es realmente importante que se desarrolle una correcta y adecuada limpieza.

- Material Positivo

Cuando la muestra o materiales con los que se trabaja resulta o se sabe que son positivos, todo el líquido de digestión o sobrenadantes que se descarten de clarificaciones, se colocan dentro de un recipiente de descarte al cual se le agrega una solución de hipoclorito de sodio al 5-6% a un volumen aproximado del 25% del volumen del líquido de desecho y se deja actuar durante 10 minutos antes de ser descartado por el drenaje.

Los materiales utilizados que pueden ser lavados (ej. el material de vidrio), son colocados dentro de una tarrina lo suficientemente grande para que los materiales puedan ser totalmente sumergidos en solución de hipoclorito de sodio al 5-6%. Se deben dejar sumergidos durante 10 minutos para luego poder ser lavados con agua y jabón y puestos a secar.

Todo el material que no puede ser lavado (ej. equipos electrónicos) se limpian con algodón embebido con alcohol 70% para destruir cualquier parásito adherido. La mesa de trabajo es desinfectada de igual manera.

Finalmente, todo el material descartable como guantes, cajas de Petri, Nylon protector de equipos entre otros se ponen en una bolsa indicada para la eliminación de desechos de peligro biológico, que son colocadas en un contenedor destinado para ese uso y son eliminados correctamente por una empresa especializada en eliminación de desechos contratada por el laboratorio.

- Material Negativo

Cuando no se encuentran larvas los restos de líquido de digestión son eliminados por el desagüe y el resto del material simplemente es lavado con agua y jabón.

- Resultado desconocido

Como generalmente se trabaja en cadena también puede ocurrir que se necesite limpiar equipos y materiales antes de ser conocido el resultado de la muestra, por lo cual éste material será tratado como si fuera positivo.

6. Test

Como por lo general la cantidad de material a digerir con que se trabaja son 20 gr el procedimiento está desarrollado para realizarse con esa cantidad, así que se debe recordar que si se va trabajar con cantidades diferentes deben calcularse las cantidades de reactivos a utilizar según se indica anteriormente (Preparación de Equipos/Materiales y Reactivos).

Se colocan los 20 gr de material a digerir en el vaso del Mixer, agregándose de 10-20 ml de solución de Agua/HCl. Luego se introduce el brazo del mismo dentro del vaso y se cubre la boca del vaso con papel film de modo de contener posible salpicado. Se somete la muestra a varios cortes por tiempos pequeños (5-10 segundos). La carne debe triturarse hasta que no queden trozos visibles de ésta, teniendo en cuenta que la carne poco triturada puede resultar en una mala digestión, mientras que, si se tritura mucho, pueden romperse las larvas que contiene el músculo (Gamble y col., 2000).

A continuación, se agrega la pepsina a la mezcla homogenizada, y posteriormente se agrega unos 40 ml de solución de Agua/HCl y se tritura por 5 segundos. Es muy importante que el HCl haya sido agregado y mezclado en el agua antes de ser agregado al homogenizado de pepsina/muestra, ya que altas concentraciones de HCl pueden inactivar enzimas como la pepsina (Gamble y col., 2000).

Se transfiere la muestra homogenizada a un Vaso de Precipitado de una capacidad superior a 600 ml que contenga dentro la barra de agitación. Usar el restante de la solución Agua/HCl para remover residuos de homogeneizado del vaso del mixer, y de ser necesario es posible ayudarse con una pequeña cantidad de agua extra utilizando una piseta.

Se coloca el Vaso de precipitado en una platina con agitador magnético a una temperatura de $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (teniendo la precaución de haberla prendido con anterioridad). Se toma y registra la temperatura de la mezcla, considerando que la misma al inicio de la digestión debe ser de $44^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Se cubre la boca del Vaso de precipitado con papel de aluminio y se activa el agitador a una velocidad que genere un remolino profundo sin salpicar.

Se deja proceder la digestión durante 30 minutos. Para determinar si la digestión ha finalizado luego de cumplidos los 30 minutos se vuelve a tomar la temperatura de la mezcla y se observa si aún hay trozos de tejido muscular sin digerir. Si la temperatura está dentro del rango estimado ($44^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) y no se observan trozos de tejido muscular sin digerir se considera que la digestión ha terminado, de lo contrario deberá continuar por algunos

minutos más sin exceder los 60 minutos en total. La razón por la cual se pone gran hincapié en controlar las condiciones de temperatura y tiempo es porque, temperaturas menores a las recomendadas pueden resultar en incompleta digestión del tejido muscular, mientras que, el sobre calentamiento ($> 50^{\circ}\text{C}$) y tiempos prolongados de digestión pueden resultar en la inactivación de la pepsina o la pérdida de larvas (ICT Quality Assurance Committee, 2012a; Nöckler y Kapel, 2007).

Luego de finalizada la digestión se retira el Vaso de precipitación de la Platina agitadora y se deja reposar la muestra durante 5 minutos.

Mientras, se prepara un sistema conformado por un soporte con dos brazos que sujeta dos ampollas de decantación de vidrio con cierre de paso, colocando primero y debajo la de 500 ml y encima de ésta una ampolla de decantación de 1000 ml. En la boca de la ampolla de decantación de 1000 ml se coloca un embudo de vidrio que contiene un tamiz de PVC con una malla de 178 μm . Por último, se coloca una caja de Petri con fondo cuadrículado sobre el pie del soporte y debajo de la ampolla de 500 ml teniendo en cuenta que los pases estén cerrados.

Cumplidos los 5 minutos, se filtra el líquido de digestión por el tamiz que se encuentra dentro del embudo pasando hacia la ampolla de decantación de 1000 ml. Se enjuaga el vaso de precipitado y la malla del tamiz usando unos 100 a 200 ml de agua destilada a temperatura ambiente. Se debe dejar reposar durante 30 minutos sin disturbio alguno, debido a que las larvas vivas enroscadas de *Trichinella* sedimentan a un rango aproximado de 1 cm por minuto y si el tiempo es menor, es probable que no todas hayan bajado hasta el fondo y no serán entonces recolectadas en el sedimento (ICT Quality Assurance Committee, 2012a).

En este punto también es importante tener en consideración los siguientes cuidados. Al momento de enjuagar el vaso de precipitado y el tamiz se debe prestar especial atención de no sobre llenar la ampolla de 1000 ml. El enjuague es para evitar que se pierdan larvas adheridas a la superficie del vaso o al tejido residual retenido en el tamiz (pequeños remanentes de grasa, fascia u otros). En el caso de que en el tamiz llegara a quedar retenido tejido muscular visible se debe remover el tejido muscular del tamiz y continuar digiriéndolo con una nueva solución Agua/HCl y pepsina y reforzar el resultado de la primera digestión (ICT Quality Assurance Committee, 2012a).

Cumplidos los 30 minutos se pasan 25 ml de sedimento de la ampolla de 1000 ml a la ampolla de 500 ml abriendo completa y rápidamente la llave de paso y cerrándola completamente una vez alcanzado el volumen necesario. La apertura rápida y completa de la llave permite un flujo rápido que previene que las larvas queden retenidas en el borde de la abertura del drenaje. Un pasaje de un mayor volumen de sedimento puede llevar a la necesidad de clarificar la muestra final. Para que esto no suceda y sea más práctico es conveniente marcar previamente la ampolla de 500 ml a los 25 ml.

Se debe adicionar 150 ml de agua destilada a temperatura ambiente utilizando una piseta a la ampolla de 500 ml y dejar reposar sin disturbios durante al menos 10 minutos. Marcar la ampolla de 500 ml a los 175 ml facilitará el trabajo.

Cumplidos los 10 minutos se pasan aproximadamente 25 ml del segundo sedimento a la caja de Petri abriendo y cerrando completa y rápidamente la llave de paso de la ampolla de 500 ml. Las cajas de Petri también pueden ser marcadas a los 25 ml para facilitar el trabajo. Se debe dejar reposar el segundo sedimento en la caja de Petri al menos un minuto para que las larvas lleguen al fondo y de este modo poder realizar una correcta lectura en la lupa binocular. Si se considera que la muestra final que se tomó es insuficiente, pueden esperarse 5 minutos y pasar una nueva muestra de sedimento a una segunda caja de Petri y leer las dos cajas. Si la muestra final tomada es muy grande o tiene muchos detritos es posible que sea necesario realizar la clarificación de la misma.

Las muestras obtenidas en las cajas de Petri deben ser leídas lo antes posible el día mismo de realizada la digestión para evitar su deterioro y si se va a demorar algún tiempo en hacerlo quizás sea preciso separarlas e identificarlas correctamente.

7. Interpretación de Resultados

Para determinar la presencia de *Trichinella* en las muestras solo basta con observar en la lupa estereoscópica lo contenido en la placa de Petri a un aumento 10 – 20x o mayor. Pueden llegar observarse larvas vivas o muertas. Las larvas vivas se identifican por su característica forma enroscada o en espiral, mientras que las larvas muertas se encuentran en forma de “C”. Las larvas vivas pueden llegar a verse activas y en movimiento cuando el ambiente en el que se encuentran es cálido.

REFERENCIAS

-Gamble, H.R.; Bessonov, A.S.; Cuperlovic, K.; Gajadhar, A.A.; van Knapen, F.; Nöckler, K.; Schenone, H.; Zhu, X. (2000) International Commission on Trichinellosis: recomendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Veterinary Parasitology* 93: 393-408.

-ICT Quality Assurance Committe (2012a) Recommendations for Quality Assurance in Digestion Testing Programs for *Trichinella*, Part 2, Essential quality assurance standards for *Trichinella* digestion assays, 13p. Disponible en: http://www.trichinellosis.org/uploads/Part_2_final_-_Digestion_assasy_final_7Feb2012.pdf. Fecha de consulta: 22/11/2017.

- Kapel, C.M.O. (2001). Sylvatic and domestic *Trichinella spp.* In wild boars: infectivity, muscle larvae distribution, and antibody response. *Journal of Parasitology*, 87: 309-314.

-Nöckler, K.; Kapel, C.M.O. (2007) Detection and Surveillance for *Trichinella*: Meat Inspection and Hygiene, and Legislation. En: Dupouy-Camet J and Murrell KD (Eds.) FAO/WHO/OIE Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of Trichinellosis. Roma, pp 69-98. Disponible en: http://www.trichinellosis.org/uploads/FAO-WHO-OIE_Guidelines.pdf. Fecha de consulta: 18/11/17.

ANEXO II

PROTOCOLO DE ELABORACIÓN DE KITS DE MUESTRAS DE PRO-EFICIENCIA

Este protocolo se armó siguiendo la metodología descrita en el trabajo experimental realizado por Forbes y col. en 1998.

1. Materiales

- Ratón infectado con larvas de *Trichinella spirallis* por lo menos 4-6 semanas antes.
- PBS en cantidades suficientes.
- Tabla de picar de plástico.
- Bisturí, tijeras, pinzas dientes de ratón.
- Mixer.
- Tamiz de 1 mm².
- Tubo cónico de 50 ml.
- PCA (Plate Count Agar).
- Cajas de Petri.
- Espátula.
- Lupa binocular.
- Papel film.
- Bolsas con cierre tipo Ziploc.
- Marcador permanente.
- Micro pipeta 20 µl.
- Probeta con capacidad suficiente

1. Obtención de quistes

Se sacrifica un ratón mediante la técnica de dislocación cervical que haya sido infectado por lo menos 4 a 6 semanas antes. Se debe quitar la piel y eviscerar obteniendo la carcasa con huesos. Se corta en piezas de aproximadamente 1 cm³ con tijera y se combina con 300ml de PBS.

Luego se homogeniza con Mixer. Se filtra pasando por un tamiz de 1mm² hacia un Vaso de Bohemia de 1000 ml. Lo que queda retenido en el tamiz es enjuagado con 300 ml de PBS adicionales.

Para ver la carga de quistes que se encuentra en la suspensión se agita el filtrado y rápidamente se toma 1ml y se pone en una caja de Petri para observar y contar los quistes en lupa binocular. Si la carga de quistes es muy baja se lava lo que quedó retenido en el tamiz todas las veces que sea necesario hasta obtener una cantidad suficiente.

Una vez obtenida una buena cantidad de quistes, se concentran para almacenarlos. Primero se completa con PBS los 1000 ml. La suspensión se deja decantar por lo menos 20 minutos, luego de lo cual se quitan 800 ml de sobrenadante. Volvemos a llevar a 1000 ml con PBS, dejamos sedimentar otros 20 minutos y luego quitamos 960 ml de sobrenadante.

El sedimento es transferido a un tubo cónico de 50 ml y se agrega PBS hasta completarlo. Se guarda refrigerado a 4°C.

2. Matrices de carne

Se elaboran a partir de carne magra retirando la grasa y tejido conectivo visible molindola hasta consistencia de hamburguesa, separándola en esferas de aproximadamente 3cm de diámetro que pesen 20 ± 1 gr. En el trabajo de Forbes y col. 1998 utilizan carne de bovino mientras que la ICT recomienda que los laboratorios utilicen para las muestras de proficiencia carne de la especie en la que se acostumbre a realizar diagnóstico y que provenga de los mismos músculos de elección para la especie (ICT Quality Assurance Committee, 2012b).

3. Transferencia y contaje de quistes

Primero se debe elaborar PCA (Plate Count Agar) y verter 10ml en caja de Petri de 85mm, dejando solidificar. Pasar 1-0,5mm² de PCA ya solidificado a una caja de Petri limpia.

Se obtienen quistes de la concentración de quistes realizada anteriormente y guardada en tubo de 50ml. Se agita y se pasan de 1-5ml a una caja de Petri a la que se le agregan 5-10 ml de PBS. Se capturan los quistes con micro pipeta de 20µl y se van depositando sobre el PCA separado en la caja limpia hasta llegar a la cantidad deseada de quistes.

Se deben remover quistes libres (sin larvas) y aquellos con más de una larva utilizando una aguja de disección. Si esto no llega a ser posible, se debe descartar el pequeño bloque de agar. Es importante que el conteo de larvas final en el bloque de agar sea contado por más de una persona.

Luego de corroborar todo lo antes mencionado en el bloque de agar, este debe ser introducido en medio de la esfera de carne cortada en dos semiesferas que a continuación son unidas utilizando las manos. Una vez transferido el bloque de agar a la matriz de carne revisar la caja de Petri en la que se encontraba para verificar que no haya quedado ningún quiste en ésta.

El control negativo se elabora colocando un pequeño bloque de agar dentro de una esfera de 20gr de carne picada magra.

Cada muestra del kit se envuelve individualmente con papel film y se identifica usando un marcador. A su vez, todas las muestras que pertenecen a un mismo kit se colocan en una Bolsa con cierre tipo Ziploc identificada correctamente. Las muestras o kits de muestras deben ser mantenidos a una temperatura de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y no deben ser congeladas (ICT Quality Assurance Committee, 2012b).

REFERENCIAS

-Forbes, L.B.; Rajic, A.; Gajadhar, A.A. (1998) Proficiency Samples for Quality Assurance in *Trichinella* Digestion Tests. Journal of Food Protection, 61 (10): 1396-1399.

-ICT Quality Assurance Committee (2012b) Recommendations for Quality Assurance in Digestion Testing Programs for *Trichinella*, Part 3, Recommendations for Quality Assurance in Proficiency Testing, 9p. Disponible en: http://www.trichinellosis.org/uploads/PART_3_final_-_PT_7Feb2012.pdf Fecha de consulta: 22/11/2017.