

TÉCNICA DE DIGESTIÓN ARTIFICIAL

1. TOMA DE MUESTRAS:

- 1.1. Tomar UNA (1) muestra, de aproximadamente CUARENTA Y CINCO GRAMOS (45 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, como alternativa puede tomarse la misma cantidad de muestra de la parte del diafragma situada cerca de las costillas o del esternón, de la musculatura de la base de la lengua, de los músculos masticadores o de la musculatura abdominal.
- 1.2. Las muestras deben liberarse de restos de aponeurosis, grasa y tendones.
- 1.3. Las muestras deben ser rotuladas e identificadas unívocamente.

2. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS:

- 2.1. Las muestras que no sean procesadas en el día de la extracción deben ser mantenidas en condiciones de refrigeración [entre DOS GRADOS CENTÍGRADOS (2 °C) y OCHO GRADOS CENTÍGRADOS (8 °C)] que ralentizan la descomposición pero evitan la congelación; en estas condiciones podrán ser procesadas hasta CUATRO (4) días posteriores a la toma de muestra.
- 2.2. Solo se aceptarán muestras congeladas en caso de que provengan de un brote, debiendo modificarse, en consecuencia, el tiempo de sedimentación.

3. INSTRUMENTAL Y REACTIVOS:

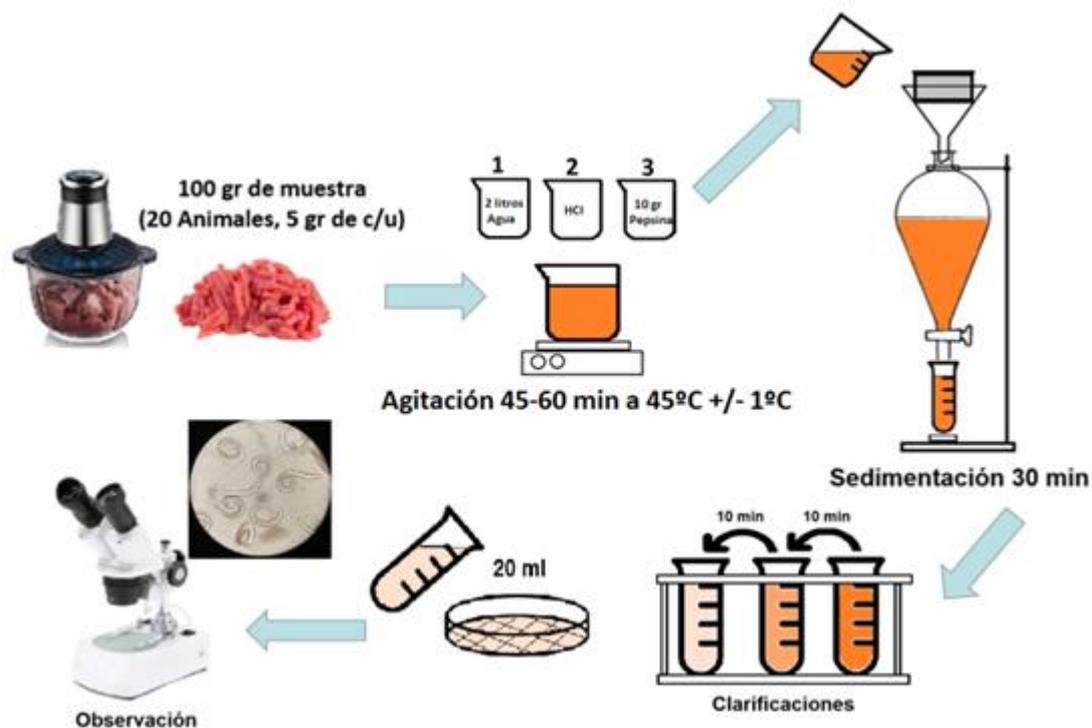
- 3.1. Cuchillo, bisturí y pinzas para la toma de muestras.
- 3.2. Bandejas numeradas, con tapa, divididas en VEINTE (20) cuadrados, también numerados, que puedan contener, cada uno, muestras de músculo de CUARENTA Y CINCO GRAMOS (45 g), aproximadamente.
- 3.3. Máquina picadora de carne (manual o eléctrica).
- 3.4. Agitador magnético provisto de una placa térmica de temperatura controlada.
- 3.5. Barra magnética (recubierta de teflón) de aproximadamente la mitad del diámetro de la base del vaso de precipitados que se utilice.
- 3.6. Ampolla cónica de vidrio de separación de una capacidad adecuada.
- 3.7. Soporte con anillos y fijación.

- 3.8. Tamiz de acero inoxidable de DIEZ CENTÍMETROS (10 cm) a DOCE CENTÍMETROS (12 cm) de diámetro, con malla, cuyo tamaño debe ser de aproximadamente CIENTO SETENTA Y SIETE MICRONES (177 μm).
 - 3.9. Embudo de vidrio de diámetro interior mínimo de DOCE CENTÍMETROS (12 cm), destinados a recibir el tamiz.
 - 3.10. Vaso de precipitado de vidrio de TRES LITROS (3 l).
 - 3.11. Probeta de vidrio graduada de CINCUENTA MILILITROS (50 ml) de capacidad.
 - 3.12. Pipeta de vidrio de DIEZ MILILITROS (10 ml).
 - 3.13. Propipeta automática o de goma o bomba de vacío.
 - 3.14. Triquinoscopio, lupa estereoscópica o microscopio que disponga de una iluminación adecuada y aumento suficiente para la correcta visualización del parásito.
 - 3.15. Papel de aluminio.
 - 3.16. Ácido Clorhídrico, calidad analítica.
 - 3.17. Pepsina: UNO EN DIEZ MIL (1:10.000) unidades *UNITED STATES PHARMACOPEIA AND NATIONAL FORMULARY* (USP-NF); correspondiente a UNO EN DOCE MIL QUINIENTAS (1:12.500) unidades *BRITISH PHARMACOPOEIEA* (BP); correspondiente a DOS MIL (2.000) unidades FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE FARMACIA (FIP) o pepsina líquida estabilizada, con una concentración mínima de SEISCIENTAS SESENTA (660) unidades de la FARMACOPEA EUROPEA por MILILITRO (ml).
 - 3.18. Tiras indicadoras de poder de hidrogeno (pH), rango UNO (1) a CATORCE (14).
 - 3.19. Agua destilada.
 - 3.20. Balanza granataria [sensibilidad máxima CERO COMA UN GRAMOS (0,1 g)].
 - 3.21. Termómetro apto para el rango de trabajo.
 - 3.22. Placas de Petri grabada en cuadrados de DIEZ MILÍMETROS (10 mm) por DIEZ MILÍMETROS (10 mm).
 - 3.23. Cubeta para el cómputo de larvas (en caso de utilización de un triquinoscopio).
4. MÉTODO:
- Procedimiento de Digestión Artificial para CIEN GRAMOS (100 g) de músculo:
- 4.1. PREPARACIÓN DEL LÍQUIDO DE DIGESTIÓN:

- 4.1.1. A un vaso de precipitado de TRES LITROS (3 l) que contenga DOS LITROS (2 l) de agua destilada, precalentada a una temperatura de CUARENTA Y CINCO GRADOS CENTÍGRADOS (45 °C), con un margen de tolerancia de más o menos UN GRADO CENTÍGRADO (1 °C), añadirle ONCE MILILITROS (11 ml) de ácido clorhídrico al TREINTA Y SIETE POR CIENTO (37 %). Pueden utilizarse otras formulaciones del ácido siempre y cuando la concentración final de la solución de digestión sea CERO COMA DOS POR CIENTO (0,2 %); a modo de ejemplo, VEINTIÚN MILILITROS (21 ml) de ácido clorhídrico al DIECINUEVE POR CIENTO (19 %).
- 4.1.2. Colocar una barra magnética en el vaso, y este en la placa precalentada del agitador magnético para comenzar la agitación.
- 4.1.3. Añadir DIEZ GRAMOS (10 g), con un margen de tolerancia de más o menos CERO COMA DOS GRAMOS (0,2 g), de pepsina o TREINTA MILILITROS (30 ml), con un margen de tolerancia de más o menos CERO COMA CINCO MILILITROS (0,5 ml), de pepsina líquida.
- 4.1.4. Picar el total de la carne que conformará la muestra de CIEN GRAMOS (100 g). En caso de utilizar picadora eléctrica se debe evitar un excesivo procesado que pudiera destruir las larvas presentes.
- 4.1.5. Trasvasar cuantitativamente la carne picada al vaso de precipitados de TRES LITROS (3 l) que contiene el agua, el ácido clorhídrico y la pepsina.
- 4.1.6. Verificar el pH en el rango UNO (1) a DOS (2).
- 4.1.7. Cubrir el vaso de precipitados con una hoja de aluminio.
- 4.2. DIGESTIÓN, FILTRADO Y SEDIMENTACIÓN:
 - 4.2.1. Agitar el líquido de digestión a una velocidad suficiente para que se forme un remolino profundo sin salpicaduras manteniendo una temperatura constante de CUARENTA Y CINCO GRADOS CENTÍGRADOS (45 °C), con un margen de tolerancia de más o menos UN GRADO CENTÍGRADO (1 °C), durante CUARENTA Y CINCO (45) a SESENTA (60) minutos (hasta que se digiera la totalidad de la carne).
 - 4.2.2. Filtrar el líquido de digestión a través del tamiz de CIENTO SETENTA Y SIETE MICRONES (177 µm) y recoger el filtrado en la ampolla cónica de decantación.

- 4.2.3. Se considera satisfactorio el proceso de digestión si no queda más del CINCO POR CIENTO (5 %) del peso de la muestra inicial sin digerir (se observa en el tamiz).
- 4.2.4. Dejar sedimentar el líquido de digestión en la ampolla cónica de decantación TREINTA (30) minutos. Si el tiempo de sedimentación es menor a TREINTA (30) minutos, es posible que no todas las larvas se hayan asentado y no se recuperen en el sedimento recolectado. El tiempo de sedimentación para muestras de músculo congelado debe extenderse hasta SESENTA (60) minutos debido a la posible existencia de larvas muertas que sedimentan a menor velocidad.
- 4.2.5. Transcurridos los TREINTA (30) minutos, abrir el robinete y recolectar CUARENTA MILILITROS (40 ml) del líquido de digestión rápidamente (flujo libre) en una probeta de CINCUENTA MILILITROS (50 ml).
- 4.2.6. Dejar reposar el extracto de CUARENTA MILILITROS (40 ml) durante DIEZ (10) minutos y luego aspirar superficialmente TREINTA MILILITROS (30 ml) de líquido sobrenadante, sin alterar el sedimento, dejando así un volumen de DIEZ MILILITROS (10 ml).
- 4.2.7. Puede ocurrir que este líquido requiera ser clarificado para su observación, en cuyo caso se procederá de la siguiente manera: agregar agua destilada a los DIEZ MILILITROS (10 ml) que quedaron en la probeta hasta recuperar el volumen de CUARENTA MILILITROS (40 ml); dejar reposar durante DIEZ (10) minutos y aspirar superficialmente TREINTA MILILITROS (30 ml) del líquido sobrenadante, dejando un volumen final de DIEZ MILILITROS (10 ml). Repetir este proceso hasta obtener una solución suficientemente límpida.
- 4.2.8. La muestra de DIEZ MILILITROS (10 ml) del sedimento restante se debe verter en una placa de Petri o en una cubeta para el recuento de larvas.
- 4.2.9. Enjuagar la probeta graduada con DIEZ MILILITROS (10 ml) de agua destilada que se agregarán a la muestra en observación obteniendo así un volumen de VEINTE MILILITROS (20 ml) para la lectura.
- 4.2.10. Los líquidos de digestión deberán observarse en el momento. Si los líquidos de digestión no se examinan en el plazo de TREINTA (30) minutos siguientes a su preparación, se deberán clarificar, conforme a lo descripto.

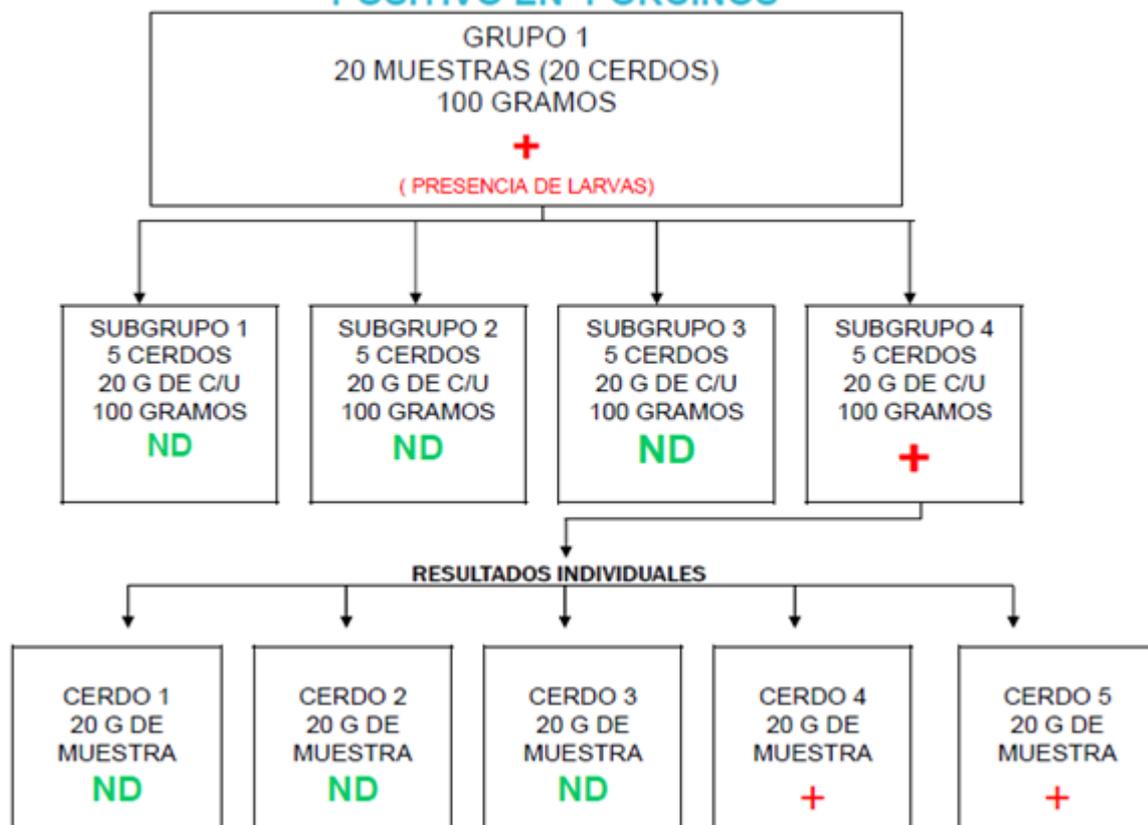
4.3. ESQUEMA TÉCNICA DIGESTIÓN ARTIFICIAL



5. RESULTADOS:

- 5.1. La presencia de UNA (1) larva es indicativa de resultado positivo, debiéndose informar la cantidad de larvas por gramo. Ante la ausencia de estas el resultado se informará como NO DETECTADO (ND)
- 5.2. En caso de resultado positivo del análisis de un *pool*, se deberá tomar una muestra de VEINTE GRAMOS (20 g) de cada cerdo, agrupándolas en grupos de CINCO (5) cerdos para ser examinadas por el método arriba descrito.
- 5.3. Los grupos que resultaran positivos de esta última observación se deberán analizar abriéndolos y examinando individualmente cada animal utilizando VEINTE GRAMOS (20 g) de muestra de cada uno.

MARCHA DE LA TECNICA LUEGO DE UN RESULTADO GRUPAL POSITIVO EN PORCINOS



6. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL ENSAYO:

- 6.1. Las balanzas y termómetros utilizados deben estar calibrados con trazabilidad metrológica en el rango de trabajo.
- 6.2. Al validar la metodología se debe asegurar un límite de detección del método de UNA (1) larva cada CIEN GRAMOS (100 g) de muestra.
- 6.3. Inactivación de Larvas de “*Trichinella spp.*”:
 - 6.3.1. Superficies y material de laboratorio: según concentración comercial del reactivo, deben prepararse las siguientes soluciones:
 - 6.3.1.1. Hipoclorito de Sodio CINCUENTA Y CINCO GRAMOS POR LITRO (55 g/l): preparar una solución al TREINTA POR CIENTO (30 %) [TRESCIENTOS MILILITROS (300 ml) de Hipoclorito de Sodio por cada SETECIENTOS MILILITROS (700 ml) de agua].
 - 6.3.1.2. Hipoclorito de Sodio CIENTO DIEZ GRAMOS POR LITRO (110 g/l): preparar una solución al QUINCE POR CIENTO (15 %) [CIENTO

CINCUENTA MILILITROS (150 ml) de Hipoclorito de Sodio por cada OCHOCIENTOS CINCUENTA MILILITROS (850 ml) de agua].

6.3.1.3. El tiempo de contacto requerido es de QUINCE (15) minutos. Posteriormente se debe proceder al lavado del material.

6.3.2. Solución de digestión:

6.3.2.1. Por cada SETECIENTOS MILILITROS (700 ml) de solución de digestión incorporar TRESCIENTOS MILILITROS (300 ml) de Hipoclorito de Sodio; CINCUENTA Y CINCO GRAMOS POR LITRO (55 g/l) o CINCUENTA Y CINCO GRAMOS POR CENTILITRO (55 g/cl).

6.3.2.2. Por cada OCHOCIENTOS CINCUENTA MILILITROS (850 ml) de solución de digestión incorporar CIENTO CINCUENTA MILILITROS (150 ml) de Hipoclorito de Sodio; CIENTO DIEZ GRAMOS POR LITRO (110 g/l) o CIENTO DIEZ GRAMOS POR CENTILITRO (110 g/cl).

6.3.2.3. El tiempo de contacto requerido es de TREINTA (30) minutos.

- 6.4. Vasos de precipitados, probetas, embudos y ampollas de decantación no deben ser de material plástico y/o teflón, para evitar la adherencia de las larvas a la superficie del recipiente.
- 6.5. Cualquier modificación a la técnica detallada en la presente disposición deberá ser aprobada por la Dirección General de Laboratorios y Control Técnico del SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA.
- 6.6. Toda otra especie susceptible a la enfermedad (con excepción del equino) podrá ser analizada utilizando la presente metodología, previa validación de esta para la matriz correspondiente.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: EX-2023-107378528- -APN-DGTYA#SENASA - ANEXO - TÉCNICA DE DIGESTIÓN
ARTIFICIAL

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 7 pagina/s.