

ZOONOSIS ALIMENTARIAS

Investigación de triquina en carne



COLEGIO OFICIAL
DE VETERINARIOS
DE MADRID



**Comunidad
de Madrid**



Edita:

Dirección General de Salud Pública
Consejería de Sanidad

© Comunidad de Madrid

Imprime:

Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid

Edición: Primera, Noviembre 2016

Tirada: 400 ejemplares

Depósito Legal: M-2681-2016

Impreso en España- Printed in Spain

Elaboración:

- Francisco Javier Castro Fernández (Laboratorio Regional de Salud Pública) Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.
- Francisco Javier Muñoz Manso (Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria) Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.
- José Samperio Rodríguez (Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria) Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

Maquetación:

- Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid

Coordinación:

- Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid.

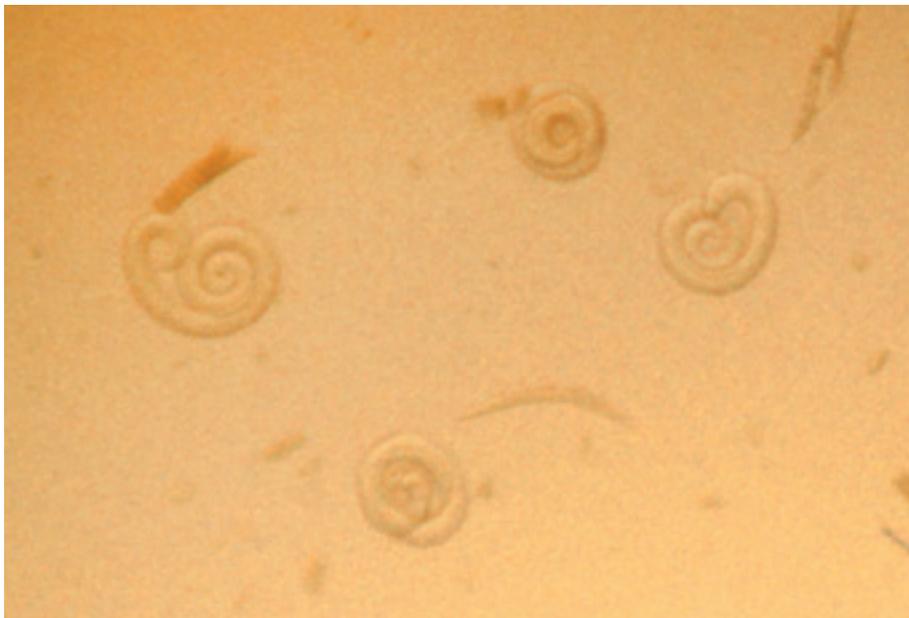


Fig. 1

La **triquinosis** es la enfermedad producida por la presencia de larvas del género *Trichinella*, dándose por el consumo de carne, o productos cárnicos crudos o insuficientemente cocinados, de especies de animales infestadas por este parásito. En España se han descrito en carnes de cerdo, jabalí o caballo, si bien en otros países se han producido casos por consumo de carne de oso, foca o morsa.

El parásito adulto se localiza en el intestino delgado de mamíferos, aves o reptiles, pero las larvas se diseminan a través del torrente sanguíneo y se enquistan en la musculatura esquelética.

Dado que esta enfermedad puede llegar a manifestarse con cuadros graves e incluso aparecer complicaciones neurológicas y cardiológicas, tanto las autoridades sanitarias a nivel global, como las distintas disposiciones normativas europeas, nacionales y autonómicas, requieren que estas carnes sean sometidas a una investigación para detectar triquina.

Esta investigación puede ser más complicada en las piezas de jabalí procedentes de monterías o en los cerdos que tradicionalmente se sacrifican para consumo familiar, que en las piezas de cerdos domésticos que proceden de mataderos autorizados, que cuentan con la presencia de Veterinarios Oficiales.

A tal fin, desde la Consejería de Sanidad, anualmente se procede a la autorización de

los Veterinarios Colaboradores para intervenir en matanzas domiciliarias de cerdos y en actividades cinegéticas, profesionales que a través de su formación acreditan su capacitación para la citada investigación.

Existen diversos métodos de laboratorio autorizados para la detección de triquinas en las carnes frescas y cuya técnica se encuentra descrita en la normativa vigente, es decir, el Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375 de la Comisión de 10 de agosto de 2015 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne (Diario Oficial de la Unión Europea L212/7 de 11.8.2015).

Esta disposición legal, elimina la utilización del tradicional examen triquinoscópico, ya que no consigue detectar las especies de *Trichinella* no encapsuladas que infectan a animales domésticos y salvajes y a seres humanos. A su vez, establece el método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético como método de referencia, por considerarlo un método recomendable para el uso rutinario.

Otros métodos equivalentes, son:

- A. Método de digestión de muestras colectivas con asistencia mecánica/técnica de sedimentación
- B. Método de digestión de muestras colectivas con asistencia mecánica/técnica de aislamiento por filtración
- C. Método de digestión automática para muestras colectivas de hasta 35 g
- D. Método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético/técnica de aislamiento por filtración y detección de larvas mediante prueba de aglutinación del látex (*sólo se considera equivalente para la detección en carne de cerdo doméstico*)
- E. Test de digestión artificial para la detección in vitro de larvas de *Trichinella* spp. en muestras de carne, PrioCHECK® *Trichinella* AAD Kit (*sólo se considera equivalente para la detección en carne de cerdo doméstico*).

A continuación, en este manual se describe el método de referencia, es decir el método de digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético.

1. Obtención y preparación de la muestra

- A partir de la muestra de carne obtenida de la canal de jabalí o cerdo, se procederá a su preparación para poder realizar la digestión enzimática, sedimentación y visualización de la muestra.

Una muestra adecuada permite encontrar más fácilmente las larvas, ya que va a haber mayor concentración de larvas por gramo, se va a facilitar la liberación de las larvas y permite una mejor diferenciación entre larvas y otros residuos.

Material necesario: (Fig. 2).

- Cuchillo y/o tijeras
- Pinzas para cortar las muestras.
- Mezclador con una cuchilla afilada.
- Balanza de precisión de al menos 0,1 g.



Fig. 2.

La cantidad de muestra a tomar, así como su naturaleza para la investigación de triquinas, va a ser distinta según se trate de cerdos domésticos o jabalíes.

Cuando se trate de **canales enteras de cerdos domésticos**, deberá tomarse una muestra de un peso mínimo de 1 gramo en uno de los pilares del diafragma, en la zona de transición entre la parte muscular y la parte tendinosa, excepto si se trata de cerdas de cría o verracos, donde la muestra será el doble, es decir, de un peso mínimo de 2 gramos.

Si no se dispone del pilar del diafragma, deberá tomarse una muestra de doble tamaño, 2 g (o 4 g en el caso de las cerdas de cría y los verracos), de la parte del diafragma situada cerca de las costillas o del esternón, o de los maseteros, o de la lengua o de los músculos abdominales.



Fig. 3. Pesadas de la muestra individual.

Si tan sólo se dispone de trozos de carne, se tomará una muestra de un peso mínimo de 5 g de músculo estriado, que contenga poca grasa y, en la medida que sea posible, esté situado cerca de los huesos o de los tendones. El mismo criterio se tomará para la carne que no esté destinada a ser muy cocida o a otros tipos de tratamiento posterior al sacrificio, o si se presente en estado congelado (Fig. 3).

De tratarse de **jabalíes**, se tomarán muestras con un peso mínimo de 10 gramos de la pata delantera, de la

lengua o del diafragma, de los que se hará la digestión a un peso mínimo de 5 gramos.

Para cada digestión, el peso total de músculo que se examine no excederá de 100 gramos (Fig. 4).

Precaución: El peso de las muestras de carne se entenderá libre de toda grasa o fascias. Se deberá poner especial cuidado al tomar muestras de músculo de la lengua a fin de evitar contaminación con la capa superficial de la misma, que es indigestible y puede impedir la lectura del sedimento.

Tras la obtención de cantidad destinada a ser la muestra, se procede a su trituración, hasta obtener una mezcla homogénea (Figs. 5, 6 y 7).

Un aspecto fundamental es la identificación de la muestra y establecer su trazabilidad (origen anatómico, conservación, tamaño de la muestra y preparación de la muestra antes de su análisis), así como de identificación del propietario o responsable del animal de origen, para contactar indicándole el resultado del análisis.

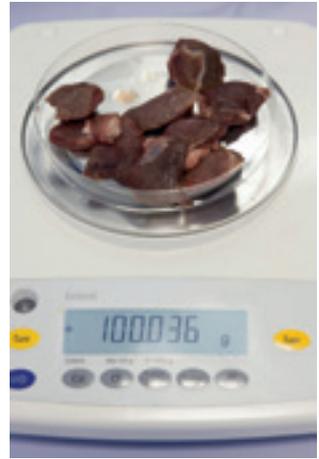


Fig. 4. Pesada del conjunto.



Fig. 5.



Fig. 6.



Fig. 7.

2. Digestión enzimática en medio ácido

- La digestión enzimática de muestras de tejido muscular, reproduce de modo artificial las condiciones de digestión en el estómago. Con ello, en una solución de pepsina con ácido clorhídrico, se eliminan las cápsulas, se procede a la liberación de las larvas de triquina, que se encuentran enquistadas entre las fibras musculares y se elimina el tejido muscular. Es decir, se trata de una digestión enzimática, donde van a ser fundamentales unos reactivos (ácido clorhídrico y pepsina) y unos parámetros (temperatura y tiempo).

Material necesario: (Fig. 8).

- Vasos de precipitados de vidrio (3 l.).
- Agitadores magnéticos.
- Placa térmica de temperatura controlada.
- Hoja de aluminio.
- Soportes con anillos y fijaciones.
- Balanza de precisión de al menos 0,1 g.
- Termómetro de una precisión de 0,5°.



Fig. 8.



Fig. 9.

– Se parte de **2 litros de agua** del grifo, previamente calentada a 46 a 48 °C, depositados en un vaso de precipitados. Se introduce el imán y se coloca el vaso sobre una placa térmica, previamente encendida a 46 °C (Fig. 9).

Precaución: Dado que a continuación se van a verter los distintos reactivos necesarios para la digestión y la muestra de carne, es necesario disponer de un vaso con suficiente capacidad, así se evitan salpicaduras.

La normativa en vigor, establece que el vaso de precipitados sea de 3 litros de capacidad.

– Adición de ácido clorhídrico

Se añaden $16 \pm 0,5$ ml de **ácido clorhídrico** de 25 % y se comienza la agitación (Fig. 10).

Precaución: Es fundamental realizar la adición del ácido clorhídrico antes que la adición de la pepsina, para conseguir una acidificación del medio, ya que esta la pepsina actúa a un pH óptimo entre 2 y 3. En medio ácido se modifican las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas, quedando más expuestos los enlaces químicos de estas, favoreciendo así su ataque por la pepsina.

– Adición de la pepsina.

Ésta podrá presentarse en forma sólida, con una concentración de 1:10 000 NF (US National Formulary), correspondiente a 1:12 500 BP (British Pharmacopoeia) y a 2 000 FIP (Fédération internationale de pharmacie), en cuyo caso se añadirán 10 gramos (± 0.2 g) o en forma líquida, con una concentración mínima de 660 unidades de la Farmacopea Europea/ml, en cuyo caso serán 30 mililitros (± 0.5 ml) (Figs. 11 y 12).



Fig. 10.



Fig. 11.



Fig. 12

Precaución: Respecto a los reactivos, es imprescindible realizar una conservación adecuada. Para ello deben respetarse las instrucciones del fabricante en cuanto a temperatura, luz y humedad de conservación. Igualmente, deberá respetarse la fecha de caducidad.

– **Añadir la carne picada** al vaso de precipitados de 3 litros que contiene el agua, el ácido clorhídrico y la pepsina. Cubrir el vaso de precipitados con una hoja de aluminio, que ayuda a mantener la temperatura constante y disminuye la emisión de vapores al ambiente (Fig 13).



Fig. 13.

Precaución: Si es posible, introducir varias veces el dispositivo de triturado del mezclador en el líquido de digestión del vaso de precipitados. En su defecto, enjuagar la taza del mezclador con una pequeña cantidad de líquido de digestión para quitar la carne que aún esté adherida al recipiente.

– **Agitar el líquido de digestión**, hasta que desaparezcan las partículas de carne (**durante 30 minutos** aproximadamente) (Fig. 14).

Precaución: Deberá regularse el agitador magnético de forma que durante su funcionamiento mantenga una temperatura constante de 44 a 46 °C. y que la velocidad de agitación del líquido de digestión, sea suficiente para que se forme un remolino profundo sin salpicaduras.

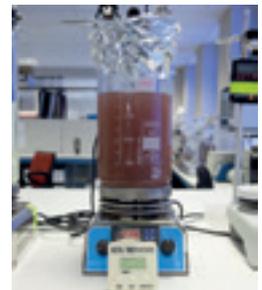


Fig. 14.

– **Finalización de la digestión:** Se procede a detener el mezclador y el líquido de digestión es vertido a través del

tamiz en el embudo de separación. Este tamiz debe tener una malla de 180 micras, un diámetro exterior de 11 cm y provisto de una rejilla de acero inoxidable (Figs. 15 y 16).



Fig. 15.



Fig. 16.

La digestión es **SATISFACTORIA** si no queda en el tamiz más del 5 % del peso de la muestra inicial

Precaución: Si se supera el 5% del peso de la muestra inicial, se puede alargar el tiempo de digestión para lo cual habrá que poner en el agitador magnético el líquido de digestión y los restos que quedaron en el tamiz. En algunas ocasiones y para determinados tipos de carne (lengua, carne de caza, etc.), los períodos de digestión pueden ser más largos, sin superarse los 60 minutos. Otra posibilidad es repetir la digestión desde el principio.

3. Sedimentación

- Si la digestión de la muestra lo que hace es liberar las larvas, el proceso de sedimentación lo que hace es que las concentra, facilitando su posterior detección visual.

Material necesario: (Fig. 17)

- Tamices
- Embudos destinados a recibir los tamices
- Probetas graduadas o tubos de centrifugación.
- Cubetas metálicas para el jugo digestivo restante.
- Pipetas y soportes para pipetas
- Embudos de separación cónicos

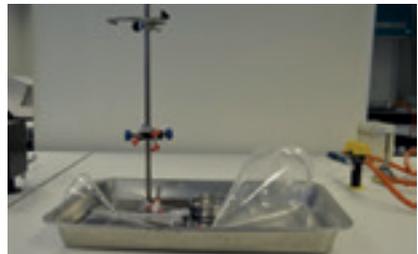


Fig. 17.

Reposo y traspaso del líquido de digestión:

Una vez trasvasado el líquido de digestión al embudo, se deja **reposar durante 30 minutos**; trascurrido este período de reposo, traspasar rápidamente una muestra de **40 ml** del líquido de digestión a la probeta graduada o al tubo de centrifugación (Fig. 18).

Precaución: La triquina tiende a sedimentar y a quedarse "fijada" en las paredes. Por ello es recomendable golpear ligeramente la pared de embudo (por ejemplo, cada 10 minutos) para facilitar a las larvas su depósito en el fondo del embudo y no en las paredes. Igualmente, se recomienda abrir la válvula "rápidamente", provocando un chorro fuerte que arrastre las larvas.

La muestra de 40 ml, se deja reposar durante 10 minutos, para, posteriormente, aspirar con cuidado 30 ml de líquido sobrenadante para retirar las capas superiores y dejar un volumen que no supere 10 ml.

Esta muestra de 10 ml del sedimento restante, se verterá en una cubeta o en una placa de petri y será la muestra sobre la que se realizará el cómputo de larvas, a la que se añadirán 10 ml como máximo de agua del grifo procedentes del enjuagado de la probeta graduada o el tubo de centrifugación (Figs. 19, 20, 21 y 22).



Fig. 18.



Fig. 19. *Trasvasar 40 ml.*

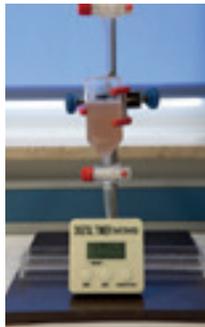


Fig. 20. *Reposo 10'.*



Fig. 21. *Extraer 30 ml sobrenadante.*



Fig. 22. *Enjuague con 10 ml de agua.*

Precaución: Los líquidos de digestión y otros residuos líquidos, se deberán mantener apartados hasta que la obtención de resultados.

4. Visualización

La observación se realizará en el triquinoscopio o al examen en el estereo-microscopio con un aumento de 15 a 20 veces.

Siempre que se observen zonas sospechosas o formas similares a parásitos, deberán aplicarse aumentos superiores, de entre 60 y 100 veces.

Material necesario: (Fig. 23.)

- Triquinoscopio o estereomicroscopio, con fuente de luz.
- Uso de triquinoscopio: cubeta para el cómputo de larvas.
- Uso de estereomicroscopio: cubeta o placas de petri.



Fig. 23.

Los líquidos de digestión se examinarán en el momento en que estén dispuestos. En ningún caso se podrá posponer el examen al día siguiente.

Cuando los líquidos de digestión no se examinen en los 30 minutos siguientes a su preparación, se deberán clarificar de acuerdo al siguiente procedimiento: Verter la muestra final de unos 40 ml en una probeta graduada y dejar reposar durante 10 minutos. Luego, retirar 30 ml del líquido sobrenadante, dejando un volumen de 10 ml. Dicho volumen se llevará a 40 ml con agua del grifo. Después de un nuevo período de reposo de 10 minutos, aspirar 30 ml del líquido sobrenadante para obtener un volumen máximo de 10 ml que se examinará en una placa de petri o en una cubeta para cómputo de larvas. Lavar la probeta graduada con 10 ml como máximo de agua del grifo y agregar el líquido obtenido a la muestra en la placa de petri o en la cubeta para el cómputo de larvas, para su examen.

Si el examen revela que el sedimento no es transparente, verter la muestra en una probeta graduada, llevar su volumen a 40 ml con agua de grifo y seguir el procedimiento descrito en la presente sección. Este procedimiento podrá repetirse de 2 a 4 veces hasta que el líquido sea lo suficientemente claro para una lectura fiable (Fig 24).

Precaución: Durante la observación se debe enfocar y desenfocar la lente para vi-



Fig. 24.

sualizar a diferentes niveles del líquido de suspensión. Además, es importante evitar movimientos bruscos, que puedan desplazar el líquido.

El Procedimiento descrito, es para realizar la investigación en un grupo de muestras, con un peso total de la 100 g de muestras a la vez. En el caso de que la cantidad muestral no supere los 15 gramos, podrá añadirse a un grupo completo de 100 gramos. Si las cantidades son superiores a 15 gramos, se deberán examinar como grupos completos. En el caso de grupos de hasta 50 gramos, los líquidos de digestión y los ingredientes podrán reducirse a 1 litro de agua, 8 ml de ácido clorhídrico y 5 gramos de pepsina.

Resultados positivos o dudosos

Cuando el examen de una muestra colectiva dé un resultado positivo o incierto, se procederá a:

- ▶ Si se trata de carne de cerdo, se tomará una nueva muestra de 20 gramos de cada cerdo, reuniendo las muestras procedentes de cinco cerdos procediendo de acuerdo a la sistemática descrita.. De esta forma se examinarán muestras de 20 grupos de cinco cerdos. Si se detectan triquinias en un grupo de muestras de cinco cerdos, se tomarán nuevas muestras de 20 gramos de cada animal del grupo y se examinarán por separado utilizando el método descrito.
- ▶ En caso de tratarse de jabalí, se tomará otra muestra de 50 gramos para un posterior análisis independiente.

De todas las muestras positivas, es perceptivo remitir una muestra al laboratorio nacional de referencia, para que éste determine las especies de *Trichinella* implicadas. Esta operación se realiza desde la Subdirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria de la Dirección General de Salud Pública de la Consejería de Sanidad.

Procedimiento de limpieza y descontaminación tras un resultado positivo o dudoso

Cuando el examen de una muestra colectiva o individual dé un resultado positivo o dudoso, se descontaminará cuidadosamente todo el material que haya entrado en contacto con la carne (la taza y la cuchilla del mezclador, el vaso de precipitados, el agitador, el sensor de temperatura, el embudo de separación cónico, el tamiz y el fórceps) dejándolo durante unos segundos en agua caliente (entre 65 °C y 90 °C). Se recomienda enjuagar a fondo cada pieza para eliminar el detergente que haya podido utilizarse en el lavado.

PUNTOS CRÍTICOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN

1. Equipos y material:

- 1.1. Se deben cumplir las tolerancias establecidas:
 - Balanza de resolución 0,1 g, que sea capaz de pesar $10 \pm 0,2$ g de pepsina
 - Termómetro de resolución 0,5 °C, que sea capaz de medir 45 ± 1 °C
- 1.2. Los equipos deben someterse a un mantenimiento preventivo y a verificaciones periódicas, y en su caso a una calibración externa.

2. Trazabilidad de la canal con la muestra de ensayo:

Debe implantarse un sistema verificable de toma e identificación de muestras que permita la identificación inequívoca del animal positivo

3. Digestión:

- 3.1. El líquido debe ser preparado de manera que no afecte la actividad de la pepsina. Es decir agregar al agua destilada, el ácido clorhídrico y por último la pepsina
 - **pH óptimo** de actividad de la pepsina 1 a 3 (se consigue con la adición de HCl)
 - Las **tolerancias** establecidas, para el volumen de HCl y peso de la pepsina deben ser respetadas.
- 3.2. Mantener durante todo el proceso de digestión la **temperatura** de 45 ± 1 °C
 - **Temperaturas mas altas** tienen como resultado la inactivación de la pepsina (≥ 48 °C)
 - **Temperaturas mas bajas** requieren tiempos mas prolongadas de digestión

4. Sedimentación: Respetar el procedimiento y los tiempos:

- 4.1. **Acortando el tiempo** de sedimentación se reduce la tasa de recuperación larvaria
- 4.2. La **recuperación del sedimento** debe realizarse con la espita abierta en su totalidad; la apertura parcial puede retener las larvas

5. Visualización de las larvas:

- 5.1. El sedimento debe clarificarse lo suficiente, de acuerdo al procedimiento para clarificar.

Debe existir una sistemática que garantice que ninguna parte de las canales analizadas es consumida antes de que el análisis para la detección de triquina haya dado negativo y dicho resultado haya sido notificado al interesado.

Cuaderno de trabajo para Investigación de Triquina

Nº tanda en el día:	Equipo usado para pesar:	Muestra fresca: <input type="checkbox"/>	Muestra congelada: <input type="checkbox"/>	Firma:
----------------------------	--------------------------	--	---	--------

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº muestra precinto										
Peso muestra (1)										
Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Nº muestra precinto										
Peso muestra										
Peso total tanda (g) (11 a 115 g).			Tara tamiz (g) - Tt:-		Peso final (g) - Pf:-		Pf - Tt =		Valoración (Pf-Tt < 5%):	

- 1) Muestra fresca. Tejido diana: cantidad mínima de muestra **1 g**. Para tanda completa peso máximo de muestra 1,15 g.
 Caza/Tejido no diana ó canal / Cerda de cría o verraco / ó muestra congelada: **5 g**. Para tanda completa peso máximo de muestra 5,75 g.
 Cerdo doméstico de cría: **1 g** de tejido diana. Para tanda completa peso máximo de muestra 1,15 g.

REACTIVOS:

HCl 35%	Marca	Lote:	Volumen: <input type="checkbox"/> 16 ± 0,5 mL	Firma:
Pepsina 3000 UI Sólida Líquida	Marca	Lote:	a) Peso: <input type="checkbox"/> 10 ± 0,3 g b) Volumen: <input type="checkbox"/> 30 ± 0,5 mL	Firma:

REACTIVOS:

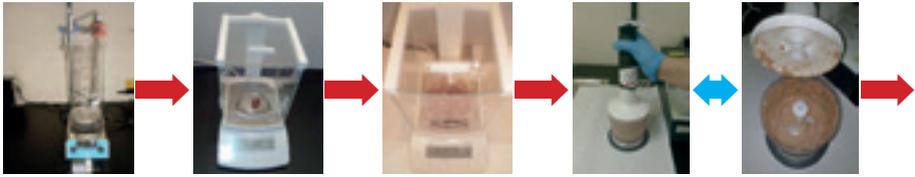
Control de proceso 45° ± 1 C	Tiempo	0'	10'	20'	30'	Firma:
	Tº					
	Termómetro <input type="checkbox"/> usado: Corrección de medida (C): Incertidumbre de medida (I):			Límite superior: [Tmax + (C) - (I)]		Límite inferior:

**SEDIMENTACIÓN:
RETENER EL SEDIMENTO**

ETAPA	Embudo de separación 30 minutos/40 ml	Tubo de centrifuga 10 minutos/10 ml	Adición de 10 ml de agua	Observación transparente
Realizado				Sí No

Resultado: **Fecha/Firma:**

INVESTIGACIÓN DE LARVAS DE TRIQUINA: ESQUEMA DE TRABAJO

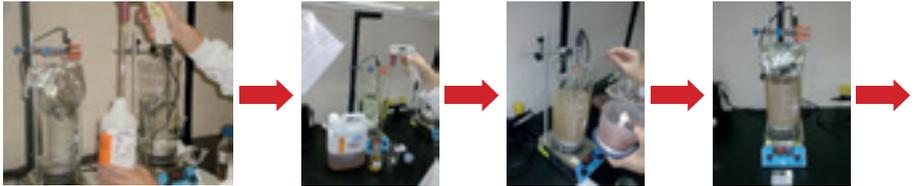


Calentar agua

Pesar piezas individuales

Pesar el conjunto

Picar



Adición HCL 25%

Adición Pepsina

Adición de carne

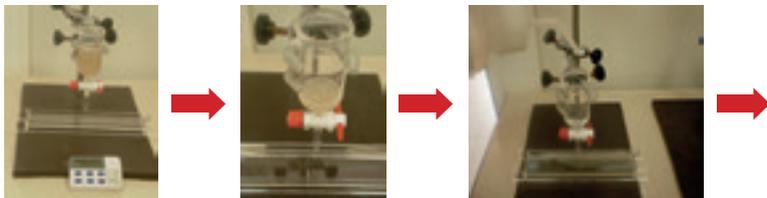
45 ± 1°C 30 minutos



Verter en tamiz

Pesar rechazo < 5%

Decantación: 30



Separación del sobrenadante: 40 mL
Decantar: 10 minutos

Aspirar 30 mL del sobrenadante.
Abrir válvula rápidamente

Enjuagar 10 mL agua



Observación de 10 mL del decantado + 10 mL agua





COLEGIO OFICIAL
DE VETERINARIOS
DE MADRID



**Comunidad
de Madrid**