

Evaluación preliminar del uso alternativo de ácido clorhídrico 19% en la técnica de digestión artificial para el diagnóstico de *Trichinella spiralis* en carne porcina

Riva E^{1,2}, Fromaget J³, Rodríguez G^{3,4}, Fiel C¹; Bernat G², Steffan P¹.

¹Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. ²CICPBA –CIVETAN. ³Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA. ⁴Frigorífico Viafer S.R.L. riva@vet.unicen.edu.ar

La trichinellosis es una enfermedad zoonótica, transmitida por el consumo de carne cruda o insuficientemente cocida que contiene larvas infectivas del nematodo *Trichinella* spp. El parásito tiene una distribución cosmopolita, y en Argentina se ha aislado principalmente *T. spiralis* a partir de cerdo doméstico y jabalí, y en menor frecuencia *T. patagoniensis*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis*^{1,3}.

Para prevenir la infección en el ser humano es fundamental inspeccionar la carne destinada al consumo. En 1999, Argentina adoptó el método de Digestión Artificial (DA) en forma obligatoria para detectar infecciones por *T. spiralis* en carnes (Resol. 740/99 SENASA; Disposición 439/99 MAA), mejorando circunstancialmente el diagnóstico de esta parasitosis a través del aumento en la sensibilidad diagnóstica^{1,4}. Este método se basa en la liberación de las larvas enquistadas o libres en el tejido muscular por la acción de un líquido digestor cuyos componentes y condiciones asemejan al proceso de digestión gástrica. El caldo digestor utilizado (agua destilada, 1% ácido clorhídrico (HCl) y 1% pepsina) a un pH regulado de 1.5 -2, digiere los tejidos a temperatura regular de entre 44 – 46 °C. Luego, por filtración, decantaciones y clarificaciones, se pueden recuperar las larvas libres y observarlas en el concentrado final por microscopía óptica¹. La función principal del HCl es bajar el pH del caldo digestor para activar la pepsina. Las reglamentaciones nacionales y provinciales describen que el HCl debe utilizarse a una concentración de 37% (fumante), haciendo del mismo, un reactivo peligroso para su manipulación y almacenamiento. Además, la adquisición de este reactivo, aunque en pequeños volúmenes, se encuentra regulada por el Registro Nacional de Precursores Químicos (Renpre) – Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico (Sedronar). Esta condición, impone exigencias adicionales de difícil cumplimiento en muchos casos, generando muchas dificultades a los pequeños laboratorios de diagnóstico para obtener el reactivo con esa concentración. Por otro lado, la OIE contempla el reemplazo del HCl 37% por otros de concentraciones inferiores (ej. 25%) mediante ajustes en los volúmenes adicionados² al caldo digestor. En Argentina, el HCl 19% es el reactivo a mayor concentración factible de adquirirse sin las limitaciones por parte del Renpre- Sedronar.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la utilización del HCl 19 % como alternativa de reemplazo en la técnica oficial de DA para el diagnóstico de *Trichinella spiralis* en carne de cerdo.

Se trabajó en tres etapas sucesivas teniendo en cuenta la Resol.740/99 SENASA como técnica de diagnóstico de *T. spiralis* en carnes porcinas para consumo, utilizando HCl 37% y la alternativa comercial HCl 19%. En la etapa 1) Se realizaron los cálculos de equivalencia química para obtener y ajustar el valor de uso del HCl 19% p/v (Anedra®). La referencia fue el HCl 37% (fumante) p/p (Biopack®) y la obtención de un pH de 1.5 – 2 en el caldo digestor. Todas las mediciones de pH se realizaron con pHmetro electrónico. En la etapa 2) se evaluó la actividad enzimática de la pepsina 1:10000 NF (U.S. National Formulary) en el medio ácido ajustado previamente a través de la capacidad digestora de tejido muscular de cerdo. Se utilizaron muestras frescas de diafragma de cerdas (n=10) y capones (n=10). Las muestras, procedentes de un frigorífico local y con diagnóstico negativo a *Trichinella* spp, fueron mantenidas a 4°C y utilizadas en las pruebas dentro de las 72 h posteriores a su obtención. Cada muestra, desprovista de grasa, aponeurosis y nervios se cortó en pequeños trozos y se procesó hasta obtener un tejido homogéneo. Se procedió a dividir en dos sub-muestras de 20 g cada una para someterlas individualmente y en paralelo, a dos tipos de DA: A) Utilizando HCl 37%

adicionado al 1% al caldo digestor para lograr un pH de 1,5 – 2, y B) Utilizando HCl 19 % adicionado al porcentaje calculado en la etapa 1 para lograr el nivel de pH requerido (1,5-2). En todas las pruebas se mantuvo una temperatura de digestión de 44°C +/- 1°C durante 45 minutos totales. La medición del pH se realizó cada 15 minutos. Finalizado el tiempo de digestión, el caldo se filtró por colador de 170 micras y se registró el peso del material remanente sin digerir. Se calculó el porcentaje de digestibilidad para cada sub-muestra siendo, Digestibilidad (%) = (Peso tejido inicial – Peso tejido remanente) x 100/ Peso inicial. Una digestibilidad mayor al 95% en cada prueba se consideró como resultado óptimo, y deficiente en aquellos con valores inferiores. En la etapa 3) se evaluó el proceso completo de DA utilizando tejido muscular contaminado adicionalmente con *T. spiralis* a fin de comprobar si el HCl 19% no alteraba la recuperación de larvas ni su estado de viabilidad, tal como ocurre con la técnica oficial. Para ello, se utilizaron muestras de tejido muscular de cerdo, con diagnóstico negativo por parte del frigorífico de origen, que se contaminaron artificialmente con quistes de *T. spiralis*. Los quistes se obtuvieron por disección individual a partir de tejido muscular de ratones Balb/c infectados experimentalmente y sacrificados a los 4 meses post-infección para asegurar el desarrollo completo de los quistes. Cada sub-muestra de 20 g se contaminó mediante la adición de 2 quistes. Las muestras (n=5) se procesaron de igual manera a la descrita en la Etapa 2. La técnica de DA se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo SENASA (decantaciones + clarificaciones + obtención de volumen final). El concentrado final se observó en placa cuadrículada bajo lupa estereoscópica. Se cuantificó el número de larvas recuperadas registrándose su viabilidad para cada grupo de sub-muestras. La recuperación de al menos 1 larva en el conteo y la observación de movimientos de enrollamiento y desenrollamiento en las larvas se consideraron como resultados óptimos de recuperación y viabilidad.

Los resultados indicaron que el agregado de HCl 19% a una concentración de 1,7% al caldo digestor fue suficiente para lograr un pH de 1,5 – 2, y mantenerlo estable a temperaturas de 44°C +/- 1°C durante 45 minutos de digestión activa. Los porcentajes de digestibilidad fueron mayores al 95% en todas las muestras de cerda y de capón analizadas utilizando el HCl a ambos porcentajes. En todas las sub-muestras contaminadas experimentalmente y sometidas a la técnica completa de DA se recuperó al menos una larva muscular de *T. spiralis* y en estado completamente viable.

El presente estudio indicaría que es factible reemplazar el HCl 37% (fumante) por el HCl 19% (comercial) en la DA, demostrando que la técnica tiene una adecuada sensibilidad para el diagnóstico de *T. spiralis* en muestras de cerdos de distintas categorías analizadas en forma individual. La factibilidad de este reemplazo es de gran importancia para el diagnóstico y control de la trichinellosis, ya que facilitaría su utilización en pequeños laboratorios o veterinarias de diagnóstico actualmente muy complicados para adquirir el HCl 37%.

Bibliografía

- 1- 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: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet. Parasitol.* 93, 393–408.
- 2- OIE - World Organisation for Animal Health (2018). Trichinellosis (Infection with *Trichinella* spp.), in: Commission, O.B.S. (Ed.), OIE Terrestrial Manual. Paris, pp.649–659. Disponible en: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrialmanual/access-online/>
- 3- Ribicich, M.M.; Fariña F.A.; Aronowicz, T.; Ercole, M.E.; Bessi, C.; Winter, M.; Pasqualetti, M.I. (2020) A review on *Trichinella* infection in South America. *Vet. Parasitol.* In press.
- 4- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) Resolución 740/99. Disponible en: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/55000-59999/58801/norma.htm>