

## VIII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – FCV-UNL

### RESUMEN EXTENDIDO

# EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL USO DE ÁCIDO CLORHÍDRICO 19% EN LA TÉCNICA DE DIGESTIÓN ARTIFICIAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE *TRICHINELLA SPIRALIS* (TRICHOCEPHALIDA: TRICHINELLIDAE) EN CARNE PORCINA

Riva E <sup>1,2</sup> (\*), Fromaget J <sup>3</sup>, Rodríguez G <sup>3,4</sup>, Fiel C <sup>1</sup>; Bernat G <sup>2</sup>, Steffan P <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Área de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Campus Universitario. Tandil, Argentina.

<sup>2</sup> CICPBA –Centro de investigación veterinaria de Tandil (CIVETAN).

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA.

<sup>4</sup> Frigorífico Viafer S.R.L.

\* Correspondencia: Riva E. E-mail: [eriva@vet.unicen.edu.ar](mailto:eriva@vet.unicen.edu.ar)

Editado por: R. Sobrero, C. Baravalle y V. Matiller

### RESUMEN

Se evaluó el uso de una formulación comercial de ácido clorhídrico (HCl) 19% como alternativa al HCl 37% fumante recomendado para el diagnóstico de larvas musculares (LM) de *Trichinella spiralis* por la técnica de digestión artificial (DA). Primero, se determinó el volumen de 19% HCl /100 ml de solución digestora necesario para alcanzar y mantener un pH de 1,5-2 durante 45 minutos a 44°C. Luego, se determinó la capacidad de la pepsina (1:10,000 NF) para digerir por DA muestras diafragmáticas porcinas (cerda adulta, n= 10 y capón, n=10) en medios acidificados por ambas formulaciones de HCl. Finalmente, se determinó el número y viabilidad de LM obtenidas por DA (con HCl 19% ó 37%) de muestras diafragmáticas de cerda (n=5) experimentalmente contaminadas con LM encapsuladas. Se requirió la adición de HCl 19% al 1,7% del volumen de agua destilada para lograr una solución digestora estable con el pH requerido durante la totalidad del proceso estudiado. Se obtuvo una digestibilidad mayor al 95% en todas las muestras de músculo sometidas a DA, sin existir diferencias significativas respecto a la formulación de HCl usado (H= 0.58; p= 0.9). No se hallaron diferencias significativas entre ambos HCl en el número y viabilidad de LM recuperadas por DA de muestras experimentalmente contaminadas (H=0.58; p=0.9). Los resultados preliminares indican que el HCl 37% fumante podría reemplazarse por una formulación comercial (HCl 19%) en la DA para el diagnóstico de *T. spiralis* en carne porcina.

*Palabras clave:* *Trichinella spiralis*, diagnóstico, cerdo, digestión artificial, ácido clorhídrico

### PRELIMINARY EVALUATION OF THE USE OF 19% HYDROCHLORIC ACID IN THE ARTIFICIAL DIGESTION TECHNIQUE FOR THE DIAGNOSIS OF *TRICHINELLA SPIRALIS* (TRICHOCEPHALIDA: TRICHINELLIDAE) IN PORK.

### SUMMARY

The use of a commercial formulation of hydrochloric acid (HCl) 19% instead of fuming 37% HCl recommended for the diagnosis of *Trichinella spiralis* muscle larvae (ML) in pork meat through artificial diagnostic (AD) technique, was evaluated. The first step was to determine the volume of 19% HCl / 100 ml of digestive fluid to reach a sustainable pH of 1.5-2 throughout 45 minutes at 44°C. After that, the capacity of pepsin (1: 10,000NF) involving both HCl concentrations to digest diaphragm pork samples (sows, n= 10 and capon, n= 10) through AD was also established. Finally, the number and viability of ML were determined in sow diaphragm samples (n= 5) experimentally contaminated with encysted ML of the parasite. The 19% HCl needed to be added at a proportion of 1.7% to allow digestive fluid to reach the proper pH level through the complete laboratory process. The weight of muscle samples before and after laboratory process, shown a digestion upper to 95% without difference between both HCl employed (H= 0.58; p= 0.9). No differences

were recorded between both HCl formulations in the number and viability of ML recovered after the digestion of samples experimentally contaminated (H= 0.58; p= 0.9). Preliminary results suggest that fuming 37% HCl could be replaced by a commercially available formulation (19% HCl) in the DA for the diagnosis of *T. spiralis* in pork meat.

**Keywords:** *Trichinella spiralis*, diagnostic, pork, artificial digestion, hydrochloric acid

---

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* en animales domésticos y silvestres (Gamble *et al.*, 2000; Ribicich *et al.*, 2020).

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 436/99 MAA), mejorando circunstancialmente el diagnóstico de esta parasitosis a través del aumento en la sensibilidad diagnóstica (Gamble *et al.*, 2000; Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). 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 óptica (Gamble, 1996; SENASA, 1999). 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 grandes 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 adicionados a la solución ácida - HCl / agua- para formular el caldo digestor (OIE- World Organisation for Animal Health, 2018). En Argentina, el HCl al 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®). Se tomó como referencia 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 (Adwa).

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 pH de referencia. 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 utilizando tiras reactivas (Merck®). 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 aquellas con valores inferiores.

En la etapa 3) se evaluó el proceso completo de DA utilizando tejido muscular contaminado con LM enquistadas de *T. spiralis*. Para ello, se utilizaron muestras de diafragma de cerdo, con diagnóstico negativo a *Trichinella* spp., que se contaminaron artificialmente con quistes musculares 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 (Figura 1). 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 DA se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito por SENASA. 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 musculares se consideraron como resultados óptimos de recuperación y viabilidad.

Los porcentajes de digestibilidad y número de LM recuperadas se compararon entre grupos mediante el Test *t* utilizando el programa Infostat (Di Renzo et al., 2018).

Los resultados del estudio indicaron que el agregado de HCl 19% a una concentración de 1.7% al caldo digestor fue suficiente para lograr un pH de 1.54 ( $\pm$  0.09), y mantenerlo estable a temperaturas de 44°C  $\pm$  1°C durante 45 minutos durante todo el proceso de digestión. Los porcentajes de digestibilidad registrados fueron mayores al 95% en todas las sub-muestras de cerda y de capón analizadas por DA utilizando HCl a ambas concentraciones (Tabla 1). No se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de digestibilidad entre los grupos analizados (H= 0,58; p= 0,9).

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 (Tabla 2). El número de LM recuperadas no varió significativamente entre procesamientos con diferentes concentraciones de HCl (H=0,27; p >0,99).

El presente estudio indicaría que es factible reemplazar el HCl 37% (fumante) por el HCl 19% (comercial) en la digestión artificial, demostrando que la técnica mantiene 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%. En este sentido, cualquier dificultad para adquirir los reactivos requeridos para implementar la DA puede influir en una sustitución por técnicas obsoletas, de menor sensibilidad diagnóstica y que actualmente no son recomendadas para el análisis de carne destinada al consumo, como lo es la triquinoscopia (Beck et al., 2005; Gamble et al., 2000). La aplicación de esta técnica

con la consecuente posibilidad de obtener resultados falsos negativos para el diagnóstico de *Trichinella* sp., serían un retroceso técnico y profesional con impacto negativo en el control de la trichinellosis con graves consecuencias en la salud pública.



**Figura 1.** Quistes de *Trichinella spiralis* obtenidos por disección de tejidos musculares de ratones Balb/c con 4 meses de una infección experimental.

**Tabla 1.** Digestibilidad (%) de diafragma de cerda y capón sometidos a la técnica de digestión artificial utilizando ácido clorhídrico (HCl) de distinta composición.

Origen Muestras (n=10)	Composición del HCl utilizado	Digestibilidad (%) media (DE)
Cerde	19 %	98,6 (1,4)
	37 % (fumante)	98,5 (1,2)
Capón	19 %	98,8 (0,7)
	37 % (fumante)	98,5 (1,1)

DE: desvío estándar

**Tabla 2.** Número y viabilidad de larvas musculares (LM) de *T. spiralis* recuperadas de muestras de diafragma de cerda infectadas artificialmente con 2 quistes desarrollados del parásito y sometidas a digestión artificial (DA) utilizando ácido clorhídrico (HCl) de distinta composición.

Muestras de diafragma (n)	Composición del HCl utilizado	Número de LM recuperadas mediana (DE)	Viabilidad de LM recuperadas
5	19 %	1 (0,55)	+
5	37 % (fumante)	2 (0,55)	+

DE: desvío estándar

+: con movimientos apreciables

## Bibliografía

Beck R, Mihaljević Ž, Marinculić A. 2005. Comparison of trichinelloscopy with a digestion method for the detection of *Trichinella larvae* in muscle tissue from naturally infected pigs with low level infections. *Vet. Parasitol.* 132, 97–100.

Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, González L, Tablada M, Robledo C. 2018. InfoStat - Software Estadístico.

Gamble HR. 1996. Detection of trichinellosis in pigs by artificial digestion and enzyme immunoassay. *J. Food Prot.* 59, 295–298.

Gamble HR, Bessonov AS, Cuperlovic K, Gajadhar AA, van Knapen F, Noeckler 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.

OIE - World Organisation for Animal Health, 2018. OIE Terrestrial Manual - Chapter 1.1.6. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases 72–87.

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.* 285, 109234.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), 1999. Sanidad Animal. Resolución 740/1999. Modifícase la Resolución N° 193/96, que estableció un método para la investigación del parásito *Trichinella spiralis* en las carnes porcinas para consumo. Bs. As., 13/7/99. Disponible en la URL [<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anejos/55000-59999/58801/norma.htm>].