

verter los 15 mililitros restantes en una placa «Petri», o en una cubeta para el cómputo de las larvas, con vistas a su examen. Lavar la probeta graduada con 10 mililitros de agua de grifo y agregar el líquido obtenido a la muestra en la placa de «Petri», o en la cubeta para cómputo de larvas y examinar.

3. En caso de resultado positivo o dudoso del examen de una muestra colectiva, se deberá tomar una muestra de 20 gramos de cada cerdo de acuerdo con las indicaciones contempladas en el anterior apartado b). Las muestras de 20 gramos procedentes de cinco cerdos se deberán reunir y examinar de acuerdo con el método antes descrito. De esta forma, se examinarán las muestras en 20 grupos de cinco cerdos. Si se descubrieran las triquinas en la muestra de un grupo de cinco cerdos, se deberán tomar muestras de 20 gramos de cada animal que pertenezca a dicho grupo y se deberán examinar individualmente de acuerdo con el método antes descrito.

V. Método de la digestión de muestras colectivas con asistencia mecánico/técnica del aislamiento por filtración

a) Instrumental y reactivos:

Los mismos que los de la letra a) del método IV, más:

Un embudo «Gelman» de 1 litro, con soporte para filtro (diámetro del soporte: 45 milímetros).

Discos filtrantes compuestos de:

Una rejilla redonda de acero inoxidable: Finura de la malla de 35 micras, diámetro del disco de 45 milímetros.

Dos anillos de goma de 1 milímetro de espesor: Diámetro exterior de 45 milímetros, diámetro interior de 38 milímetros.

La rejilla se deberá colocar entre los anillos y se fijará con una cola de dos componentes que se adapten a los dos materiales (acero inoxidable y goma).

Un matraz «Erlenmeyer» de 3 litros provisto de un tubo lateral para aspiración.

Una bomba de filtración.

Bolsas pequeñas de plástico de una capacidad mínima de 80 mililitros.

Un saco de sosa.

«Rennilase» 1:150.000 unidades «Soxlet» por gramo.

b) Toma de muestras:

Igual que la letra b) del método IV.

c) Método:

1. Procedimiento de digestión:

A) Grupos completos de muestras (100 a la vez):

Igual que en el apartado 1.A) del punto 1 de la letra c) del método IV.

B) Grupos de menos de 100 muestras:

Igual que en el apartado 1.B) del punto 1 de la letra c) del método IV.

2. Aislamiento de las larvas por filtración:

Agregar al líquido de digestión 300-440 gramos de hielo en laminillas o de hielo triturado, para obtener un volumen de 2 litros, aproximadamente. En el caso de grupos más pequeños, la cantidad de hielo deberá reducirse proporcionalmente.

Agitar el líquido de digestión hasta que el hielo se funda. Dejar reposar el líquido de digestión enfriado, durante tres minutos, por lo menos, para que las larvas puedan enrollarse.

Colocar el embudo «Gelman» provisto de un soporte para filtro, en el cual se encuentra un disco filtrante, sobre un matraz «Erlenmeyer» conectado a una bomba de filtración.

Introducir el líquido de digestión en el embudo «Gelman» y filtrar. Hacia el final, se podrá acelerar el paso del líquido a través del filtro, procediendo a una aspiración mediante la bomba de filtración. Terminar la aspiración exactamente antes de que el filtro se seque, es decir, cuando queden entre 2 y 5 mililitros de líquido en el embudo.

Después de la filtración de todo el líquido de digestión, quitar el disco filtrante y colocarlo en una pequeña bolsa de plástico de 80 mililitros agregando de 15 a 20 mililitros de solución de «rennilase». Para obtener la solución de «rennilase» se introducirán 2 gramos de «rennilase» en 100 mililitros de agua de grifo.

Practicar una doble soldadura en la pequeña bolsa de plástico y colocarla en el «Stomacher» entre la pequeña bolsa interior y la pequeña bolsa exterior.

Triturar en el «Stomacher» durante tres minutos, por ejemplo. Entre tanto, el aparato se utiliza para el análisis de un grupo completo o incompleto de muestras.

Después de tres minutos, quitar del «Stomacher» la pequeña bolsa de plástico que contiene el disco filtrante y la solución de «rennilase» y abrirla con la ayuda de tijeras. Introducir el líquido en una cubeta para el cómputo de larvas, o en una placa de «Petri». Lavar la pequeña bolsa con 5 o 10 mililitros de agua, que luego se introducirá en la cubeta para la triquinoscopia, o en una placa de «Petri» para examen en el estereomicroscopio.

Los líquidos de digestión deberán examinarse en el momento en que estén dispuestos. En ningún caso se podrá postergar el examen para el día siguiente.

Es importante no utilizar nunca discos filtrantes que no estén perfectamente limpios y no secar nunca discos filtrantes si no están limpios.

Para limpiar los discos es preciso dejarlos en una solución de «rennilase» durante al menos ocho horas. Antes de su utilización, se deberán lavar en el «Stomacher» en una solución de «rennilase».

3. En caso de resultado positivo o dudoso del examen de una muestra colectiva, se deberá tomar una muestra de 20 gramos de cada cerdo, de acuerdo con las indicaciones contempladas en la anterior letra b). Se deberán reunir las muestras de 20 gramos procedentes de cinco cerdos y examinarlas de acuerdo con el método anterior. De esta forma, se examinarán las muestras en 20 grupos de cinco cerdos. Si se descubrieran las triquinas en una muestra de un grupo de cinco cerdos, se deberán tomar las muestras de 20 gramos de cada animal que pertenezca a dicho grupo y se examinarán de acuerdo con el método antes descrito.

VI. Método de la digestión de muestras colectivas con utilización de un agitador magnético

a) Instrumental y reactivos:

Un cuchillo y pinzas para la toma de muestras.

Bandejas divididas en 50 cuadrados que puedan contener, cada uno, muestra de carne de 2 gramos, aproximadamente. Un molinillo.

Un agitador magnético provisto de una placa térmica de temperatura controlada y una barra magnética (recubierta de teflón) de 5 centímetros, aproximadamente.

Embudos de separación cónicos de una capacidad de 2 litros.

Soportes con anillos y fijaciones.

Tamices, finura de la malla de 177 micras, de un diámetro exterior de 11 centímetros provistos de una rejilla de acero inoxidable.

Embudos de un diámetro interior mínimo de 12 centímetros destinados a recibir el tamiz.

Un vaso de precipitados de 3 litros.

Probetas graduadas de una capacidad aproximada de 50 mililitros o tubos de centrifugación.

Un triquinoscopio provisto de una tabla horizontal o un estereomicroscopio que disponga de una iluminación adecuada.

Una cubeta para el cómputo de larvas (en caso de utilización de un triquinoscopio).

La cubeta deberá estar formada por placas acrílicas de un espesor de 3 milímetros y deberá presentar las siguientes características:

- i) Fondo de la cubeta: 180 x 40 milímetros dividido en cuadrados.
- ii) Placas laterales: 230 x 20 milímetros.
- iii) Placas frontales: 40 x 20 milímetros.

El fondo y las placas frontales deberán estar fijos entre las placas laterales, de manera que formen dos pequeñas asas en los dos extremos. La parte superior del fondo deberá estar entre 7 y 9 milímetros más elevada con relación a la base del cuadrado formado por las placas laterales y frontales. Las placas se fijarán con una cola adecuada al material.

Varias placas de «Petri», si se utiliza un estereomicroscopio, cuyo fondo esté dividido en cuadrados de 10 x 10 milímetros mediante un instrumento puntiagudo.

Una hoja de aluminio.

Ácido clorhídrico al 25 por 100.

Concentración de pepsina: 1:10.000 NF (US National Formulary); correspondiente a 1:12.500 BP (British Pharmacopea); correspondiente a 2.000 FIP (Federación Internacional de Farmacia).

Agua de grifo calentada a una temperatura de 46-48 °C.

Varios recipientes de 10 litros que se utilizarán para la descontaminación del instrumental, mediante un tratamiento como el formol, y para el juego digestivo que quede en caso de resultado positivo.

Una balanza de precisión de 0,1 gramo.

b) Toma de muestras:

1. Cuando las canales están enteras tomar una muestra de, aproximadamente, 2 gramos de uno de los pilares del diafragma, en la zona de transición entre la parte muscular y la parte tendinosa; si no hubiera pilar del diafragma, tomar la misma cantidad en la parte del diafragma situada cerca de las costillas o del esternón, o en la musculatura de la lengua, o en los músculos masticadores, o también en la musculatura abdominal.

2. Para los trozos de carne tomar una muestra de, aproximadamente, 2 gramos, en los músculos esqueléticos que contenga poca grasa y, en la medida que sea posible, cerca de los huesos o en los tendones.

c) Método:

1. A) Grupos completos de muestras (100 a la vez):

Triturar en el molinillo 100 muestras de, aproximadamente, 1 gramo, tomadas de cada muestra individual, de acuerdo con las indicaciones de la letra b). Hacer funcionar el aparato tres o cuatro veces durante un segundo.

Llevar la carne picada a un vaso de precipitados de 3 litros y espolvorear con 10 gramos de pepsina. Introducir en el vaso de precipitados 2 litros de agua de grifo calentada a una temperatura de 46-48 °C y agregar 16 mililitros de ácido clorhídrico.

Introducir varias veces el dispositivo de triturado del molinillo en el líquido de digestión que se encuentre en el vaso de precipitados, para quitar de él las sustancias que aún tenga adheridas.

Colocar la barra magnética en el vaso de precipitados y cubrirlo con una hoja de aluminio.

Colocar el vaso de precipitados en la placa precalentada del agitador magnético y comenzar la agitación. Antes de empezar el proceso de agitación, se deberá regular el agitador magnético de tal forma que, durante el funcionamiento, pueda mantenerse una temperatura constante de 44-47 °C.

Durante el proceso de agitación, el líquido de digestión deberá girar a una velocidad lo suficientemente elevada para permitir la formación de un profundo remolino central, sin provocar salpicaduras.

Agitar el líquido de digestión durante treinta minutos, parar el aparato, filtrar el líquido de digestión a través de un tamiz colocado en un embudo y recoger el filtrado en un embudo de separación.

Dejar el líquido de digestión en el embudo de separación durante treinta minutos.

Después de treinta minutos, traspasar rápidamente una muestra de 40 mililitros del sedimento del líquido de digestión a la probeta graduada o al tubo de centrifugación.

Dejar reposar la muestra de 40 mililitros durante diez minutos y luego aspirar 30 mililitros del líquido sobrenadante, dejando así un volumen de 10 mililitros.

La muestra de 10 mililitros del sedimento restante se verterá en una cubeta para el cómputo de larvas o en una placa de «Petri».

Enjuagar la probeta graduada o el tubo de centrifugación con, aproximadamente, 10 mililitros de agua de grifo, que se agregará a la muestra en la cubeta de cómputo de larvas o en la placa de «Petri». Luego, proceder a la observación en el triquinoscopio o el examen en el estereomicroscopio, según el caso.

Los líquidos de digestión deberán observarse desde el momento en que estén dispuestos. En ningún caso, se podrá postergar el examen para el día siguiente. Si los líquidos de digestión no se examinan en el plazo de treinta minutos siguientes a su preparación, se deberán clarificar de la siguiente manera: Verter la muestra final de, aproximadamente, 40 mililitros en una probeta graduada y dejar sedimentar durante diez minutos. Después de dicho tiempo, quitar 30 mililitros del líquido sobrenadante, con el fin de obtener un volumen de 10 mililitros. Dicho volumen se llevará a 40 mililitros con agua de grifo. Después de un nuevo período de reposo de diez minutos, quitar por aspiración 30 mililitros del líquido sobrenadante, para obtener un volumen de 10 mililitros que se examinará en una placa de «Petri» o en una cubeta para cómputo de larvas. Lavar la probeta graduada con 10 mililitros de agua de 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 está claro, se deberá verter la muestra en una probeta graduada, y con agua de grifo se deberá llevar su volumen a 40 mililitros. Luego se aplicará el método antes mencionado.

B) Grupos de menos de 100 muestras:

Eventualmente se podrán agregar 15 muestras, de 1 gramo cada una, a un grupo de 100 muestras y se podrán examinar al mismo tiempo que estas últimas, de acuerdo con el método descrito en la letra c). En caso de más de 15 muestras se deberán examinar en calidad de grupo completo. En el caso de grupos que lleguen hasta 50 muestras, los líquidos de digestión podrán reducir a 1 litro.

2. En caso de resultado positivo o dudoso del examen de una muestra colectiva, se deberá tomar una muestra de 20 gramos de cada cerdo, de acuerdo con las indicaciones contempladas en la anterior letra b). Las muestras de 20 gramos procedentes de cinco cerdos, se deberán reunir y examinar de acuerdo con el método antes descrito. De esta forma, se examinarán las muestras en 20 grupos de cinco cerdos. Si se detectan las triquinas en una muestra de un grupo de cinco cerdos, se deberán tomar las muestras de 20 gramos de cada animal que pertenezca a dicho grupo y se deberán examinar de acuerdo con el método antes descrito.

VII. *Método de digestión automática de muestras colectivas de hasta 35 gramos*

a) Instrumental y reactivos:

Cuchillo o tijeras para cortar las muestras.

Bandejas divididas en 50 cuadrados que puedan contener, cada uno de ellos, muestras de carne de 2 gramos, aproximadamente.

Mezclador «Trichomatic 35» con pieza de filtración.

Solución de ácido clorhídrico al 8,5 por 100 \pm 0,5 por 100 en peso.

Filtros de membrana de policarbonato transparente de 50 milímetros de diámetro con poros de 14 micrómetros.

Concentración de pepsina: 1:10.000 NF (US National Formulary), correspondiente a 1:12.500 BP (British Pharmacopeia), correspondiente a 2.000 FIP (Federación Internacional de Farmacia).

Balanza de precisión de 0,1 gramo.

Pinzas planas.

Varios portaobjetos de microscopio de 5 centímetros de lado como mínimo o varias placas de «Petri» de, al menos, 6 centímetros de diámetro, cuyo fondo esté dividido en cuadrados de 10 x 10 milímetros mediante un instrumento puntiagudo.

Estereomicroscopio de transmisión de luz (15 a 60 aumentos) o triquinoscopio provisto de una tabla horizontal.

Cubo o recipiente para la recogida de líquidos residuales.

Varios recipientes de 10 litros que se utilizarán para la desinfección del instrumental, mediante un tratamiento (como el formol) y para el jugo digestivo sobrante, en caso de resultado positivo.

b) Toma de muestras:

1. Cuando las canales estén enteras, tomar una muestra de, aproximadamente, 2 gramos en uno de los pilares del diafragma en la zona de transición entre la parte muscular y la parte tendinosa. Si no hubiera pilar del diafragma, tomar la misma cantidad en el borde costal del esternón, en parte del diafragma, en los músculos masticadores o bien en la musculatura abdominal.

2. Para los trozos de carne, tomar una muestra de, aproximadamente, 2 gramos, en los músculos esqueléticos que contengan poca grasa y, en la medida que sea posible, cerca de los huesos o de los tendones.

c) Método:

1. Procedimiento de digestión:

Colocar el mezclador con la pieza de filtración, conectar el tubo de desagüe y conducir el tubo al cubo de residuos.

Al encender el mezclador, se inicia el calentamiento.

Antes de comenzar se deberá abrir y cerrar la válvula del fondo situada bajo la cámara de reacción.

A continuación, agregar un máximo de 35 muestras, de, aproximadamente, 1 gramo cada una (a 25-30 °C), tomadas de cada una de las distintas muestras, según lo dispuesto en la letra b). Asegurarse de que se han eliminado los trozos de tendón de mayor tamaño, ya que pueden obstruir el filtro de la membrana.

Llenar de agua, hasta el borde, la cámara de líquidos conectada al mezclador (400 mililitros, aproximadamente).

Verter 30 mililitros, aproximadamente, de ácido clorhídrico (8,5 por 100) hasta el borde de la cámara de líquidos más pequeña, que también está conectada.

Colocar un filtro de membrana bajo el filtro grueso en el soporte para el filtro de la pieza de filtración.

Por último, agregar 7 gramos de pepsina.

Respetar escrupulosamente el orden de las operaciones para evitar la descomposición de la pepsina.

Cerrar la tapa de la cámara de reacción y de líquidos.

Seleccionar el tiempo de duración de la digestión: Un período de digestión corto (cinco minutos), en el caso de cerdos de edad normal de sacrificio, y un período prolongado (ocho minutos) para las muestras restantes.

La digestión automática comienza al oprimir el botón de puesta en marcha del mezclador (la digestión y la filtración subsiguiente tiene lugar de forma automática). El proceso finaliza entre diez y trece minutos después y se detiene automáticamente.

Abrir la tapa de la cámara de reacción y comprobar que ésta se halla vacía. Si en la cámara hay espuma o líquido de digestión, aplicar el procedimiento descrito en el punto 5 de esta letra c).

2. Recuperación de larvas:

Desmontar el soporte para el filtro y trasladar el filtro de membrana a un portaobjetos o a una placa de «Petri».

Examinar el filtro de membrana con microscopio o triquinoscopio.

3. Limpieza del material:

En caso de resultado positivo, llenar de agua hirviendo dos tercios de la cámara de reacción del mezclador. Llenar de agua corriente la cámara de líquidos conectora hasta cubrir el sensor de nivel inferior. A continuación tiene lugar el programa automático de limpieza. Desinfectar el soporte para filtro y el material restante, por ejemplo, utilizando formol.

Al finalizar la jornada laboral, llenar de agua la cámara de líquidos del mezclador y llevar a cabo un programa estándar.

4. Uso de filtros de membrana:

Cada filtro de membrana de policarbonato no podrá usarse más de cinco veces. Deberá darse la vuelta al filtro después de cada uso. Igualmente, después de cada uso se comprobará que el filtro no haya sufrido daño alguno que lo haga inservible.

5. Método que deberá aplicarse cuando la digestión sea incompleta y, en consecuencia, no se puede efectuar la filtración:

Cuando se efectúe el procedimiento automático del mezclador, de conformidad con el punto 1 de la letra c), si al abrir la tapa de la cámara de reacción y se comprueba que hay espuma o líquido en ella, se llevará a cabo el procedimiento siguiente:

Cerrar la válvula del fondo situada bajo la cámara de reacción.