

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 556**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2010 E 10737791 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2443455**

54 Título: **Nuevo procedimiento para aislar Trichinella u otros parásitos a partir de tejido orgánico**

30 Prioridad:

19.06.2009 DE 102009025542
06.05.2010 CH 700102010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2014

73 Titular/es:

BAUER, PHILIPP (100.0%)
Wabergstrasse 5
8345 Adetswil, CH

72 Inventor/es:

BAUER, PHILIPP

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 440 556 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevo procedimiento para aislar *Trichinella* u otros parásitos a partir de tejido orgánico

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, que contiene proteasas activas en medio básico, siendo éstas preferiblemente una endopeptidasa, en particular una serina endopeptidasa, y teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10. Por lo demás, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, que contiene por ejemplo una serina endopeptidasa, como por ejemplo Alcalase®, que comprende opcionalmente las etapas de (a) triturar mecánicamente la carne que va a examinarse; (b) macerar la carne que va a examinarse mediante la adición de una disolución de digestión; (c) macerar con movimiento simultáneo de la mezcla de base de digestión y/o tratamiento por ultrasonidos simultáneo; (d) inactivar la maceración; (e) filtrar el macerado; y (f) controlar, detectar, diagnosticar y/o tipificar una infestación por parásitos. Por lo demás se incluyen usos de enzimas de digestión activas en medio básico, por ejemplo de una serina endopeptidasa en un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne. La presente invención proporciona también serina endopeptidasas en el uso en un procedimiento de diagnóstico para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne. Finalmente también se da a conocer un kit, que comprende las enzimas activas en medio básico y/o una disolución de digestión básica. También se describe el uso de las enzimas activas en medio básico y/o de las disoluciones de digestión básicas en procedimientos de diagnóstico de infecciones con parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas intactos.

Las triquinas (*Trichinella*) son un género de nematodos del filo *Nematoda* con un modo de vida parasitario. Los mamíferos, aves, anfibios, reptiles, peces y seres humanos sirven como huésped intermedio y final. Los principales transmisores a los seres humanos son los animales cuya carne está infectada por triquinas o su carne cruda o cocida insuficientemente, en particular de cerdos, caballos y animales de caza. Mediante cocción o mucho frío pueden destruirse las triquinas.

Las triquinas están extendidas por todo el mundo por varias especies. Hay ocho especies, siendo las más importantes que existen en Europa *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella pseudospiralis* y *Trichinella nativa*. Otras especies son *Trichinella murrelli* (que existen en particular en regiones neárticas), *Trichinella nelsoni* (que existe en particular en Etiopía), *Trichinella papuae* (que existe en particular en Papúa Nueva Guinea) y *Trichinella zimbabwensis* (que existe en particular en Zimbabue). *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella nelsoni* y *Trichinella nativa* tienen mamíferos como huésped. *Trichinella pseudospiralis* tiene mamíferos y aves como huésped. *Trichinella papuae* y *Trichinella zimbabwensis* tienen mamíferos y reptiles como huésped. El nematodo parasitario *Trichinella* spp. puede infectar muchas especies diferentes, entre ellas seres humanos, cerdos, ratas, osos, caballos y aves. En los países del oeste de Europa las triquinas aparecen principalmente en el "ciclo selvático", en el que los zorros y roedores propagan los gusanos al ingerir animales infectados. En zonas del norte también pueden servir como huésped intermedio osos, perros de trineo y focas. Un "ciclo urbano" está igualmente extendido; en éste los agentes patógenos se propagan principalmente mediante ratas y cerdos.

Las triquinelas adultas alcanzan una longitud de hasta 4 mm (hembras) o 1,5 mm (machos). Puede reconocerse claramente el extremo posterior engrosado que alberga el intestino. Las larvas se enquistan en el tejido muscular y forman en el mismo un "complejo nutritivo de células nodriza", una cápsula, que se abastece en abundancia con vasos sanguíneos y de este modo mantiene la larva con vida. Alcanza un tamaño de aproximadamente un milímetro y es altamente infecciosa. Sin embargo, existen también variantes que no forman una cápsula, tal como por ejemplo *Trichinella pseudospiralis*.

Los quistes musculares ingeridos se disgregan en el intestino delgado y así se liberan las larvas. Las larvas penetran en el epitelio del intestino delgado y se desarrollan en el plazo de 30 horas dando un animal adulto; después tiene lugar el apareamiento. En el intestino delgado, las hembras dan a luz de manera vivípara hasta 1500 larvas. Las larvas penetran a continuación a través del intestino delgado y alcanzan así la linfa o el torrente sanguíneo. Son llevadas por el cuerpo y se asientan sobre todo en el tejido muscular estriado transversalmente con buen riego sanguíneo. Un tejido preferiblemente infestado es el diafragma, los músculos de la masticación y la lengua. Allí comienza la formación del "complejo nutritivo de células nodriza", que sigue siendo infeccioso mientras vive el parásito. A partir del quinto mes se producen en el tejido humano una calcificación, continuando siendo viables las triquinas musculares enquistadas presumiblemente todavía de 5 a 10 años. Con un tiempo de incubación de desde 8 hasta 15 días se desarrollan a partir de las larvas que se encuentran en primer lugar en el intestino delgado gusanos adultos. A este respecto, además de evoluciones de la enfermedad a menudo asintomáticas también aparecen debilidad general, dolores de estómago, náuseas, vómitos y diarrea; tras de 1 a 3 semanas entonces fiebre, dolor muscular y edemas en la zona de los ojos. Estos síntomas duran en la mayoría de los casos hasta un año y desaparecen después sin consecuencias permanentes. Como complicación puede infestarse el músculo cardíaco, con lo que la infección por gusanos puede seguir una evolución mortal. El cuadro clínico provocado por

triquinas se denomina triquinosis. Las infecciones están sujetas en la Unión Europea a obligación de declaración y es obligatorio declararse en Alemania según la Ley alemana de protección contra las infecciones.

La medida preventiva más importante es el reconocimiento triquinoscópico prescrito por ley, que también se denomina examen triquinoscópico. Por esto se entiende el examen microscópico de carne para determinar la presencia de triquinas tras la matanza, pudiendo reconocerse de manera selectiva las cápsulas de las larvas o las larvas. A este respecto, para el consumo por parte de seres humanos, determinada carne de cerdos, équidos, jabalíes, osos, zorros, nutrias y tejones, así como todos los demás animales que pueden ser portadores de triquinas, está sujeta a la obligación de examen (animales de matanza con obligación de examen).

Se diferencian esencialmente dos métodos para detectar *Trichinella* spp. en animales. El primer método se denomina triquinoscopia o examen triquinoscópico. En este método de detección directo se comprime el tejido de las muestras de triquinas, que se toma de los pilares principales del diafragma y de la musculatura de las patas delanteras para el examen, en un denominado compresor (es decir compresor de vidrio compuesto por dos plaquetas de vidrio) y a continuación se examina microscópicamente. Este método es poco sensible y requiere mucho trabajo. Además, con este método no pueden identificarse triquinas sin cápsulas (no formadoras de cápsulas). El segundo método es un método de digestión artificial con asistencia mecánica. A este respecto, el tejido muscular que rodea las larvas se digiere artificialmente por medio de imitación de la digestión natural añadiendo pepsina en medio ácido, para liberar a este respecto las larvas. A continuación se examinan las larvas microscópicamente. El reconocimiento triquinoscópico está regulado por el "Reglamento (CE) n.º 2075/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne". El procedimiento usado en el estado de la técnica, en el que se imita la digestión natural añadiendo enzima pepsina, una aspartato endopeptidasa, y se realiza la digestión en medio ácido, usa la forma de pepsina disponible comercialmente, que se obtiene del estómago del cerdo.

Los procedimientos usados en el estado de la técnica están regulados, tal como se mencionó anteriormente, por el "Reglamento (CE) n.º 2075/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne". El método de detección de referencia es el procedimiento con utilización de un agitador magnético. Los procedimientos de detección equivalentes al método de detección de referencia son: (A) método con asistencia mecánica (técnica de sedimentación); (B) método con asistencia mecánica (técnica de aislamiento sobre filtro "On-Filter-Isolation"); (C) procedimiento de digestión automático con el aparato tricómico; así como examen triquinoscópico (compresor). El método de detección de referencia y los métodos de detección que son equivalentes a este método de detección de referencia se describen en el "Reglamento (CE) n.º 2075/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne". Todos los procedimientos de detección descritos en el estado de la técnica se realizan en una disolución de digestión ácida. En el caso del examen triquinoscópico (compresor; "triquinoscopia") se trata de un método puramente mecánico (compresión entre dos plaquetas de vidrio).

Los métodos a base de ELISA más nuevos son más sensibles, pero por el momento no están autorizados para exámenes de canales corporales individuales según el "Reglamento (CE) n.º 2075/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne". Además, en el método a base de ELISA se tarda mucho hasta que se dispone de los resultados. Además, los procedimientos a base de ELISA requieren una conversión serológica del huésped, antes de que pueda tener lugar una detección correspondiente. Sin embargo, esta conversión serológica lleva cierto tiempo (por regla general de 18 días a 5 semanas).

Para poder obtener una autorización para un examen rutinario, debe proporcionarse una capacidad de comparación y sensibilidad similares con los métodos de examen habituales de los procedimientos ya validados y autorizados. Los nuevos métodos autorizados, manteniendo la equivalencia legal, deben representar una alternativa a los métodos ya autorizados.

Según disposiciones de la UE, se pretende que la triquinoscopia ya no esté autorizada como método de examen convencional.

Se describe un procedimiento de digestión para la liberación y determinación de *Trichinella* en la carne, en el que la carne se tritura en una mezcladora en el intervalo de ácido a neutro (pH de 2,0 a 7,2) con adición de pepsina o bromelina, tripsina o papaína y la disolución resultante se sedimenta para un análisis posterior. Se describe la asistencia del procedimiento mediante la utilización de ultrasonidos, de un agitador magnético, mediante variación de la temperatura y con movimiento (véase el documento US 3 892 529 A).

Además van Knapen *et al.* (véase van Knapen, F.; Tijdschrift voor diergeneeskunde, 1987, 112: 1095-1100) describen estudios comparativos para la detección de sarcosporidiosis bovina. A este respecto, la carne que va a examinarse se digiere artificialmente usando tripsina en el intervalo neutro. A continuación se examina el sedimento macroscópicamente para determinar una infección con *Sarcocystis* spp.

El aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas, que contienen tejido intacto, se describe en el

estado de la técnica, pudiendo estar contenidos en las muestras biológicas también microorganismos, bacterias y virus (véase el documento US 2005/009 045 A1). A este respecto, las células se incuban con adición de un tensioactivo catiónico y una proteasa en un tampón, que tiene preferiblemente un pH de desde 5,0 hasta 7,0, hasta que se liberan los ácidos nucleicos. A continuación se aísla el ácido nucleico liberado. Las proteasas descritas a este respecto son subtilisinas, subtilasas y serina proteasas alcalinas.

Además, en el estado de la técnica se describe un reactivo de diagnóstico que contiene biopartículas y se usa para la producción de muestras para controles positivos para procedimientos de detección de ácido nucleico (véase el documento WO 2009/144 132 A1). El reactivo descrito puede contener enzimas tales como proteinasa K o subtilisinas, aislándose a continuación de la lisis de las biopartículas, tales como virus, bacterias, protozoos u hongos, los ácidos nucleicos liberados.

El documento WO 02/33 129 A2 describe material de control positivo para la amplificación de ácidos nucleicos, conteniendo el material de control positivo microorganismos en una muestra biológica. A este respecto se describe en particular un procedimiento, en el que se producen microorganismos no patógenos, digiriendo o modificando las proteínas de superficie de los microorganismos parcialmente con enzimas tales como papaína, quimotripsina, tripsina o pepsina. El microorganismo, que se pasa a una forma no patógena, es un parásito intracelular.

Un procedimiento para la determinación de bacterias en muestras tales como leche o carne homogeneizada con la adición de detergentes y enzimas proteolíticas tales como subtilisinas se describe en el documento US 5 798 221 A, estando el material de partida del procedimiento en estado líquido. A este respecto se degradan y se lisan completamente en particular células somáticas, eucariotas, y se disgregan las partículas proteicas y los restos celulares de estas células somáticas, para poder detectar selectivamente las bacterias en la muestra.

Los métodos de examen usados actualmente para detectar *Trichinella* tienen una serie de desventajas. Todos los procedimientos, que se basan en una digestión artificial en el intervalo ácido, requieren relativamente mucho tiempo y mucho trabajo. Especialmente los costes de materiales, que deben utilizarse para el examen, son verdaderamente elevados. Esto es atribuible en particular al elevado precio de la enzima pepsina, que debe añadirse en grandes cantidades a la digestión artificial mencionada anteriormente en el intervalo ácido. Debido a la escasez a nivel mundial de pepsina, los precios para esta enzima han aumentado mucho. No existe certeza de si la demanda de pepsina podrá cubrirse a largo plazo. Dificultades de abastecimiento podrían conducir a que el control de triquinas prescrito por ley ya no pueda realizarse. Una desventaja adicional radica en que la pepsina se encuentra en primer lugar en forma de polvo y de este modo el personal técnico, durante la realización de las pruebas habituales descritas anteriormente, es decir durante la creación del ensayo y durante la verdadera realización de los procedimientos habituales descritos anteriormente, está expuesto de manera permanente al efecto nocivo y tóxico de los polvos finos. Además, en caso de la digestión habitual en el intervalo ácido, preferiblemente con pepsina, existe la desventaja de que los parásitos que deben detectarse, es decir por ejemplo las triquinas, sobreviven y por consiguiente pueden seguir siendo infecciosos. Esto implica un posible riesgo de infección, en particular para las personas descritas anteriormente, que están expuestas de manera permanente a estos parásitos infecciosos durante la realización de los procedimientos de detección. En los procedimientos habituales se usa obligatoriamente ácido clorhídrico (HCl). El cloruro de hidrógeno es un gas incoloro, que tiene un olor penetrante, es corrosivo y tóxico en concentraciones altas. Durante la inspiración pueden producirse irritaciones de las mucosas y de las vías respiratorias, que pueden conducir a una bronquitis aguda o pulmonía. El ácido clorhídrico es corrosivo y debe evitarse imprescindiblemente el contacto con la piel. Por consiguiente, la exposición permanente al HCl que debe utilizarse obligatoriamente durante la realización de los ensayos descritos anteriormente representa un peligro adicional.

El objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos alternativos y ventajosos y medios para aislar *Trichinella* u otros parásitos de tejido orgánico, en particular formadores de cápsulas.

El problema técnico se soluciona proporcionando un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, comprendiendo este procedimiento la maceración de la carne en una disolución de digestión básica, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10. La disolución de digestión básica contiene igualmente una enzima de digestión activa en medio básico, tal como una endopeptidasa, por ejemplo una serina endopeptidasa, tal como por ejemplo Alcalase®. Sorprendentemente se mostró que en el intervalo básico una disolución de digestión, que contiene una enzima de digestión activa en medio básico de este tipo (preferiblemente Alcalase® (subtilisina Carlsberg)), puede, sin desventajas reconocibles con respecto al procedimiento usado en el estado de la técnica, conseguir la maceración de la carne que va a examinarse, para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas en la carne. La detección de triquinas en sí de la presente invención es sorprendentemente, tal como se ilustra entre otros en los ejemplos siguientes, al menos equivalente al procedimiento descrito en el estado de la técnica. Esto es tanto más sorprendente, dado que en el estado de la técnica hasta el momento sólo se describen procedimientos, que digieren carne en el intervalo ácido mediante pepsina. A este respecto, se intenta imitar las operaciones en el estómago, sabiéndose que las operaciones en el estómago están optimizadas de manera natural para la digestión, entre otros, de alimentos con alto contenido en proteínas tal como la carne. A este respecto, en el estómago se mezcla en particular el quimo con el jugo gástrico, que está compuesto esencialmente por la enzima proteolítica

pepsina y ácido clorhídrico. Mediante las células parietales del estómago se produce ácido clorhídrico. Éste ha acidificado tras de media a una hora todo el contenido del estómago. El ácido hace que la enzima amilasa sea ineficaz, destruye los agentes patógenos que han entrado con el alimento y desnaturaliza las proteínas. Las células principales secretan la enzima inactiva pepsinógeno, que se activa mediante el ácido clorhídrico para dar pepsina. La pepsina divide las proteínas en péptidos más pequeños, que más adelante se descomponen adicionalmente. El valor de pH en el estómago se encuentra por el ácido clorhídrico secretado a aproximadamente 0,8.

Tal como se ilustra en los ejemplos, se muestra sorprendentemente que es posible la detección de parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne mediante la maceración de la carne con una enzima de digestión activa en medio básico (en este caso una serina endopeptidasa) en una disolución de digestión básica. A diferencia del estado de la técnica hasta la fecha, se muestra por tanto sorprendentemente que en el intervalo básico una serina endopeptidasa, preferiblemente Alcalase® (subtilisina Carlsberg), puede, sin desventajas reconocibles con respecto al procedimiento usado en el estado de la técnica, conseguir la maceración de la carne que va a examinarse, para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas (intactos) en la carne. Una ventaja adicional es que las enzimas usadas, en particular la serina endopeptidasa, preferiblemente Alcalase®, tienen mejor precio que las enzimas descritas en el estado de la técnica, tal como por ejemplo pepsina.

La solución del problema técnico mediante los procedimientos y los usos dados a conocer en el presente documento es también sorprendente en este sentido, dado que el documento US 5 798 221 A enseña que mediante el uso de subtilisinas (enzimas, que son activas en el intervalo básico) pueden degradarse y lisarse completamente células somáticas, eucariotas, y disgregarse las partículas proteicas y los restos celulares de estas células somáticas. A este respecto, las bacterias permanecen selectivamente intactas en la muestra, que así pueden detectarse. Basándose en esta enseñanza, el experto hubiera esperado que también los parásitos que deben detectarse (que están compuestos por células somáticas, eucariotas) se degradaran y lisaran completamente en el intervalo básico con adición de subtilisina.

La solución del problema técnico mediante las formas de realización de esta invención presenta una serie de ventajas con respecto al procedimiento descrito en el estado de la técnica. Así puede prescindirse del HCl usado en el estado de la técnica, dado que el procedimiento según la invención se realiza en el intervalo básico. Esto tiene la ventaja de que pueden evitarse la exposición permanente al HCl utilizado en el estado de la técnica y con ello posibles peligros para el personal técnico durante la realización de las pruebas habituales descritas anteriormente, es decir durante la creación del ensayo y durante la verdadera realización de los procedimientos habituales descritos anteriormente y los daños tóxicos y permanentes asociados a los mismos. Igualmente se evita también de manera permanente el efecto nocivo y tóxico de los polvos finos de pepsina durante la preparación del ensayo y la realización del ensayo (pepsina se encuentra en primer lugar en forma de polvo), dado que la subtilisina, a diferencia de la pepsina, se encuentra en forma líquida.

La solución del problema técnico mediante las formas de realización de esta invención presenta además la ventaja con respecto al procedimiento descrito en el estado de la técnica, que los parásitos que deben detectarse, es decir por ejemplo las triquinas, no sobreviven y por consiguiente ya no son infecciosos. Por consiguiente se evita un posible riesgo de infección.

Una ventaja adicional del procedimiento según la invención con respecto al procedimiento descrito en el estado de la técnica es que, tal como se ilustra en los ejemplos, la digestión con Alcalase® tiene lugar de manera significativamente más rápida que una digestión con pepsina.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, que contiene por ejemplo una serina endopeptidasa, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10.

El término "esencialmente intactos", tal como se usa en el presente documento, se refiere preferiblemente a los parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas que deben detectarse en el procedimiento. Éstos están "esencialmente intactos", cuando la morfología de los parásitos que deben detectarse puede verse o reconocerse macroscópicamente. A este respecto, los parásitos pueden estar completamente intactos. Sin embargo, el término no se refiere sólo a parásitos completamente intactos, sino que comprende también fragmentos de los parásitos, preferiblemente de las triquinas y/o trozos de las cápsulas. A este respecto se incluyen en particular fragmentos, que el experto puede reconocer como trozos o fragmentos de los parásitos que deben detectarse. En una forma de realización especial, el término "esencialmente intactos" delimita cuando puede verse o reconocerse entre aproximadamente el 5% y el 100% de la morfología de todo el organismo de los parásitos que deben detectarse macroscópicamente. En una forma de realización adicional, puede verse o reconocerse el 50%, 60%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 98% o 99% de la morfología de todo el organismo de los parásitos que deben detectarse macroscópicamente.

El término "disolución de digestión", tal como se usa en el presente documento, resulta conocido en general para el

experto y comprende una mezcla homogénea, que está compuesta por al menos dos sustancias químicas y tal como se usa en el presente documento y se describe en lo sucesivo, sirve para digerir la carne, para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos. Una disolución está compuesta por una o varias sustancias disueltas (solutos) y un disolvente, que por regla general es líquido. Una

5 “disolución de digestión básica” resulta conocida en general para el experto y comprende por consiguiente una disolución acuosa, que puede formar iones hidróxido (OH⁻). En una forma de realización preferida, esta disolución de digestión básica comprende una o varias enzimas utilizadas, seleccionándose el intervalo de pH de tal manera que se encuentra en el óptimo de pH de las enzimas utilizadas en cada caso.

El experto conoce en general que el pH es una medida de la reacción ácida o alcalina de una disolución acuosa. El

10 valor de pH es un número adimensional, que caracteriza el pH. El valor de pH se define como el logaritmo de base diez negativo de la actividad de los iones hidrógeno. Apoyándose en la constante de disociación del agua, $K_{Dis} = c(H^+) \cdot c(OH^-) = 10^{-14}$ moles²/litro², los intervalos de valores para agua pura y disoluciones acuosas diluidas a 22°C se dividen en: pH < 7 corresponde a una disolución con acción ácida; pH = 7 corresponde a agua absolutamente pura o a una disolución neutra; pH > 7 corresponde a una disolución alcalina (acción básica). En la mayoría de las

15 disoluciones acuosas los valores de pH se encuentran entre 0 (muy ácido) y 14 (muy alcalino).

El experto conoce y está familiarizado con un gran número de métodos para determinar el valor de pH de una disolución con diferentes métodos, por ejemplo procedimientos electrónicos, por medio de potenciometría o por medio de colorantes indicadores, tales como por ejemplo tornasol, fenolftaleína, naranja de metilo o azul de bromotimol. El experto sabe de y conoce procedimientos adicionales para la determinación del valor de pH.

Según la invención, la “disolución de digestión básica” comprende una disolución de digestión, en la que la enzima (de digestión) utilizada es activa y despliega su actividad enzimática en el intervalo básico. Es decir, que según la enzima utilizada, se selecciona un intervalo de pH básico, en el que se encuentra el óptimo de pH de la enzima utilizada en cada caso. A este respecto, el experto conoce en general que el valor de pH tiene una influencia decisiva sobre la cinética de la enzima y por consiguiente sobre la evolución temporal de las reacciones enzimáticas.

20 En este sentido, una magnitud vital es la velocidad de reacción. Es una medida de la variación de la concentración de sustrato en el tiempo, es decir de la cantidad de sustancia de sustrato, que se hace reaccionar en un determinado volumen de reacción por unidad de tiempo (unidad: mol/(l·s)). Además de las condiciones de reacción tales como temperatura y concentración de sal de la disolución, concentraciones de la enzima y de los sustratos y presencia de efectores (activadores o inhibidores), la velocidad de reacción depende en particular del valor de pH de la disolución.

25 Tal como se mencionó anteriormente, la actividad enzimática está relacionada con la velocidad de reacción. Indica cuánta enzima activa se encuentra en una preparación enzimática. Las unidades de la actividad enzimática son Unit (U) y Katal (kat), definiéndose 1 U como aquella cantidad de enzima, que en las condiciones indicadas hace reaccionar un micromol de sustrato por minuto: 1 U = 1 μmol/min. Variaciones en el valor de pH de la disolución tienen a menudo efectos drásticos sobre la actividad enzimática, dado que el valor de pH puede influir en la carga de aminoácidos individuales importantes para la catálisis en la enzima. Más allá del óptimo de pH, se reduce la actividad enzimática y en algún momento se detiene. Algo similar es aplicable a la concentración de sal o la fuerza iónica en el entorno.

30

35

A este respecto, el término “carne” comprende por ejemplo carne tras la matanza de animales de matanza, pero también carne de animales para taxidermia, o también muestras de carne para el diagnóstico *in vitro* de infecciones con parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas intactos. Tal como se usa en el presente documento, el término “carne” se refiere en particular a carne de animales de matanza con obligación de examen, conociendo el experto en general el término “animales de matanza con obligación de examen”. Sin embargo, en el sentido más amplio, la carne que va a examinarse también puede proceder de mamíferos, peces, reptiles, aves o anfibios. Por consiguiente, la carne que va a examinarse puede proceder por ejemplo de cerdos, corzos, ganado vacuno, ciervos, gamuzas, alces, jabalíes, équidos, osos, zorros, nutrias, perros mapache (*Nyctereutes procyonoides*), avestruces, cocodrilos, caballos así como reses de matanza o animales de matanza, animales domésticos y animales salvajes tales como caza de pelo, caza de pluma, caza de concha, jabalíes, caza mayor, caza menor, corzos, caza de animales carnívoros, caza de animales grandes, caza de animales pequeños o también tejones. Además, la carne que va a examinarse también puede comprender de acuerdo con la presente invención la carne de peces. Por ejemplo, se conoce que los arenques también pueden estar infestados con parásitos. Sin embargo, la carne de peces que va a examinarse puede proceder no sólo de arenques, sino de todos los peces que resulten conocidos para el experto. Sin embargo, la carne también puede proceder de todos los demás animales que pueden estar infectados con parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas. Preferiblemente, la carne también puede proceder por tanto de otros animales, que sean portadores de parásitos del filo *Nematoda* (nematodos), en particular portadores de triquinas, tales como *Trichinella*, o que estén infectados con éstos. Además, la carne que va a examinarse también puede comprender de acuerdo con la presente invención la carne, que se obtenga mediante la caza de animales de caza. “Animales de caza” de acuerdo con la presente invención comprende la totalidad de las especies de animales que pueden cazarse que existen en la tierra. En particular, el término “carne” comprende carne de poblaciones de animales que son adecuados para el consumo por seres humanos. La carne que va a examinarse procede preferiblemente de animales ya muertos, en particular sacrificados. Sin embargo, en el presente documento también se incluye el uso de una enzima de digestión activa en medio básico, una serina endopeptidasa, o una enzima del grupo de enzimas de las subtilisinas, tales como

40

45

50

55

60

Alcalase® (subtilisina Carlsberg) o Alcalase 2,5L® para su uso en un procedimiento de diagnóstico para la detección de una infección con parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas en el sentido de la presente invención. En este caso, la carne también puede proceder de animales aún vivos. La carne puede ser tanto carne de músculo como carne de otros tejidos. Por consiguiente, la carne puede proceder de otro tejido, no puramente muscular, tal como por ejemplo diafragma o lengua.

La invención se refiere igualmente a un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, que contiene una enzima de digestión activa en medio básico, tal como una serina endopeptidasa, como por ejemplo Alcalase®. Este procedimiento puede comprender las siguientes etapas: (a) triturar mecánicamente la carne que va a examinarse; (b) macerar la carne que va a examinarse mediante la adición de una disolución de digestión; (c) macerar con movimiento simultáneo de la mezcla de base de digestión y/o tratamiento por ultrasonidos simultáneo; (d) inactivar la maceración; (e) filtrar el macerado; y (f) controlar, detectar, diagnosticar y/o tipificar una infestación por parásitos.

Según la invención la trituración mecánica de la carne también puede tener lugar en presencia de la disolución de digestión descrita en el presente documento (y/o de la enzima de digestión activa en el intervalo básico).

El término "maceración", tal como se describe en el presente documento, delimita el procedimiento para disgregar tejido orgánico. El término delimita en el sentido clásico en primer lugar no una operación química, sino una puramente física, dado que en sí no se produce ninguna reacción química. "Maceración" se refiere en el sentido clásico a un procedimiento físico, en el que un cuerpo u objeto se expone durante algún tiempo a la acción de un líquido tal como por ejemplo agua, aceite o alcohol, que sirven como disolvente para determinadas sustancias contenidas de este objeto, el producto se denomina macerado. A este respecto, el objeto o cuerpo no se disgrega como tal, sino que sólo determinados componentes del mismo pasan al líquido, que sirve como disolvente. Preferiblemente, el cuerpo u objeto debe entenderse como la carne descrita anteriormente. Sin embargo, el término "maceración", tal como se describe y se usa en este caso en la presente invención, comprende no sólo la operación puramente física, sino que describe más bien una operación (bio)química en desarrollo, en la que la carne, tal como en la reacción de digestión descrita a continuación, se disgrega y/o al menos se digiere superficialmente o empieza a digerirse y a este respecto libera preferiblemente los parásitos dado el caso presentes, tal como por ejemplo triquinas. En el contexto de la presente invención esta trituración física de la carne, la maceración, tiene lugar por tanto en la disolución de digestión básica descrita en el presente documento usando una enzima de digestión activa en medio básico, tal como una serina endopeptidasa, por ejemplo subtilisina/Alcalase®.

La maceración en el sentido de esta invención también puede preceder a una etapa puramente mecánica de trituración de carne o trozos de carne.

Tal como se ilustra en los ejemplos, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10, conteniendo la disolución de digestión una enzima de digestión activa en medio básico, en particular una serina endopeptidasa, pudiendo comprender este procedimiento las siguientes etapas: (a) triturar mecánicamente la carne que va a examinarse; (b) macerar la carne que va a examinarse mediante la adición de la disolución de digestión básica; (c) inactivar la maceración con digestión; (d) filtrar el macerado; y (e) controlar, detectar, diagnosticar y o tipificar una infestación por parásitos, siendo la razón de carne/disolución de digestión básica preferiblemente de 1:10. En una forma de realización adicional, la razón puede diferir de esto y ascender por ejemplo a 1:5 ó 1:20.

En el procedimiento según la invención se usa preferiblemente una serina endopeptidasa, perteneciendo la enzima al grupo de enzimas de las subtilisinas.

Tal como se describió anteriormente, los procedimientos según la invención se basan en el uso de disoluciones de digestión básicas, que comprenden enzimas de digestión activas en medio básico, tales como serina endopeptidasas. Estas enzimas también pueden ser las enzimas usadas en los ejemplos del grupo de enzimas de las subtilisinas. Sin embargo, el experto conoce enzimas de digestión activas en medio alcalino/básico adicionales tales como proteasas alcalinas, tratándose en una forma de realización en el caso de estas proteasas alcalinas de aminopeptidasas alcalinas (EC 3.4.11), cisteína peptidasas alcalinas (EC 3.4.22) o metalopeptidasas alcalinas (EC 3.4.24). También éstas pueden utilizarse según la invención, refiriéndose los ejemplos proporcionados a las serina proteasas utilizadas preferiblemente. Sin embargo, la invención comprende también el uso de disoluciones de digestión básicas en el procesamiento de carne, en las que se utilizan varias, es decir al menos 2 enzimas de digestión, que son activas en medio básico.

En el caso de las enzimas de digestión activas en medio básico, que van a usarse según la invención, pueden usarse enzimas, tales como subtilisinas, que se producen de manera recombinante o no recombinante.

Las enzimas que van a utilizarse según la invención pueden ser subtilisinas. La subtilisina puede seleccionarse en particular de Alcalase® (subtilisina Carlsberg) y Alcalase 2,5L®. Puede adquirirse Alcalase® por ejemplo de la empresa Novozymes A/S, 2880 Bagsvaerd, Dinamarca con el nombre de producto "Alcalase ® 2,5 L DX

(temperatura 40-50; pH 7,0-9,5)".

Las enzimas de digestión básicas que van a aprovecharse en los procedimientos, usos y kits proporcionados en el presente documento pueden utilizarse ventajosamente en una concentración de desde 5 hasta 80 g por litro de baño de maceración, por ejemplo 5,0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 g por litro. Alcalase® (subtilisina Carlsberg) se utilizó en particular en los ejemplos adjuntos en una concentración de desde 20 hasta 40 g por litro de baño de maceración, es decir por ejemplo 20, 25, 30, 35 o 40 g por litro. El experto puede deducir sin problemas concentraciones útiles de las enzimas de digestión básicas que van a aprovecharse en los procedimientos, usos y kits proporcionados y determinarlas en ensayos de rutina.

Según la invención se usa una disolución de digestión básica con un valor de pH de entre pH 7,3 y 10.

10 El valor de pH de la disolución de digestión es preferiblemente mayor que pH 7,5, 7,8, 8,0 u 8,5. Tal como se muestra en los ejemplos, la disolución de digestión puede tener un pH de entre pH 7,3 y 9, por ejemplo pH 8,0 o pH 8,5. Otros valores de pH de la disolución de digestión son por ejemplo 7,5, 7,8, 8,0, 8,5, 9,0 o 9,5. En una forma de realización preferida adicional, según la enzima utilizada, se selecciona un intervalo de pH básico, en el que se encuentra el óptimo de pH de la enzima activa en medio básico utilizada en cada caso.

15 En una forma de realización adicional, el procedimiento descrito anteriormente comprende una disolución de digestión, conteniendo la disolución de digestión sales, tal como por ejemplo cloruro de sodio (NaCl).

En particular, la disolución de digestión utilizada en el procedimiento según la invención puede contener opcionalmente componentes adicionales, pudiendo ser éstos emulsionantes de grasa, tensioactivos y/u otros adyuvantes. En una forma de realización adicional, la disolución de digestión puede contener colorantes o agentes de coloración, con los que puede darse color a los parásitos que deben detectarse. Los parásitos a los que se ha dado color de esta manera pueden facilitar la detección óptica/visual de los parásitos en las muestras y/o la tipificación de los parásitos. En una forma de realización, los emulsionantes de grasa también comprenden detergentes. Algunos detergentes usados con frecuencia son Triton X-100®, Triton-X-114®, NP-40®, CHAPS, Tween-20®, Tween-40®, Tween-80®, octilglucósido, octiltioglucoído, Brij-35, Brij-58, SDS y similares, no siendo esta lista exhaustiva. Se diferencia generalmente entre detergentes iónicos y no iónicos, mencionándose a continuación sólo ejemplos individuales de las respectivas clases:

detergentes iónicos:

detergentes aniónicos (a base de sulfato, sulfonato o carboxilato)

perfluorooctanoato (PFOA o PFO)

30 perfluorooctanosulfonato (PFOS)

dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de amonio y otras sales de alquilsulfato

lauret-sulfato de sodio, también conocido como lauriletorsulfato de sodio (SLES)

alquilbencenosulfonato

jabones o sales de ácidos grasos

35 detergentes catiónicos (a base de cationes amonio cuaternario)

bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) también conocido como bromuro de hexadeciltrimetilamonio y otras sales de alquiltrimetilamonio

cloruro de cetilpiridinio (CPC)

amina de sebo polietoxilada (POEA)

40 cloruro de benzalconio (BAC)

cloruro de benzetonio (BZT)

detergentes zwitteriónicos (anfóteros)

CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato)

dodecilbetaína

45 cocamidopropilbetaína

cocoanfoalicinato

detergentes no iónicos:

alquil-poli(óxido de etileno)

polisorbatos: a base de polioxietilenglicol, incluyendo la serie Tween (por ejemplo Tween 20, Tween 80), la serie Brij, la serie de detergentes Triton, por ejemplo Triton (por ejemplo Triton X-100)

5 alquifenol-poli(óxido de etileno)

copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (conocidos comercialmente con los nombres poloxámeros o poloxaminas)

alquil-poliglucósidos, incluyendo:

octilglucósido

10 decilmaltósido

alcoholes grasos:

alcohol cetílico

alcohol oleílico

cocamida MEA, cocamida DEA

15 óxido de dodecildimetilamina

El experto conoce además también emulsionantes/emulsionantes de grasa y detergentes adicionales. Un detergente es una sustancia orgánica soluble en agua, que reduce la tensión superficial del agua y se une a la grasa. Se entiende por esto tensioactivos tanto que se producen de manera natural como producidos sintéticamente (emulsionantes y agentes humectantes). Por tanto, el término "detergente" designa una sustancia o una preparación, que contiene jabones y/u otros tensioactivos y está destinada para procesos de lavado y de limpieza. Los detergentes pueden tener diferentes formas (líquido, polvo, pasta, barrita, placa, unidades conformadas, figuras, etc.) y formar parte de la disolución de digestión según la invención. Sin embargo, estos emulsionantes/emulsionantes de grasa/detergentes también pueden añadirse tras la digestión al medio básico. Por consiguiente al emulsionante/emulsionante de grasa/detergente se le puede añadir tanto antes, durante como después de la digestión una enzima activa en medio básico y usarse según la invención.

En una forma de realización según la invención, la disolución de digestión básica comprende un emulsionante de grasa, siendo el emulsionante/emulsionante de grasa preferiblemente Supralan UF®. Los detergentes, emulsionantes/emulsionantes de grasa etc. pueden utilizarse en las concentraciones habituales. Por ejemplo, puede utilizarse Supralan UF® en una concentración de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 30 g, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 20 g, desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 15 g, o desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10 g por litro de baño de maceración, por ejemplo 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2, 3, 4, 25, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 25, 27 o 30 g por litro. Supralan UF® se utilizó en particular en los ejemplos adjuntos en una concentración de por ejemplo 8 g por litro de baño de maceración. El experto puede deducir sin problemas concentraciones útiles de las enzimas de digestión básicas que van a aprovecharse en los procedimientos, usos y kits proporcionados y determinarlas mediante ensayos de rutina, para impedir, por ejemplo, floculaciones tal como de grasa.

Tal como se describió anteriormente, los procedimientos según la invención se basan en la utilización de disoluciones de digestión básicas, que, tal como se muestra en los ejemplos, contienen enzimas de digestión activas en medio básico, tal como por ejemplo serina endopeptidasas. Estas disoluciones de digestión pueden contener también en una forma de realización adicional un emulsionante/emulsionante de grasa. Por consiguiente, según la invención pueden utilizarse disoluciones de digestión, para eventualmente impedir y/o reducir las floculaciones que se producen durante el procedimiento realizado según la invención. Esto tiene la ventaja de que el procedimiento según la invención no se obstaculiza esencialmente, si llegasen a producirse estas precipitaciones. Por consiguiente, la presente invención comprende también con respecto a los ejemplos proporcionados en el presente documento una disolución de digestión básica tal como se describe en el presente documento, que puede contener igualmente un emulsionante/emulsionante de grasa. Una disolución de digestión de este tipo comprende además de las enzimas de digestión activas en medio básico también emulsionantes/emulsionantes de grasa.

En otra forma de realización preferida, la disolución de digestión básica descrita en el presente documento contiene adyuvantes adicionales, pudiendo seleccionarse los adyuvantes del grupo que consiste en coenzimas, sustratos enzimáticos, catalizadores, etc. Estas coenzimas, sustratos enzimáticos, catalizadores, etc. preferiblemente son también activos en el intervalo básico.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención comprende un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, que contiene una serina endopeptidasa, pudiendo tener lugar la maceración también con tratamiento por ultrasonidos simultáneo, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención comprende un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10, que contiene por ejemplo una serina endopeptidasa, teniendo lugar la maceración por ejemplo con movimiento simultáneo y/o agitación simultánea. En una forma de realización adicional, la maceración tiene lugar con movimiento simultáneo y/o agitación simultánea con un agitador magnético.

En otra forma de realización, el procedimiento descrito en el presente documento comprende una maceración de carne/maceración con digestión de carne en medio básico, realizándose este procedimiento preferiblemente a una temperatura de entre 40 y 65°C. En una forma de realización adicional, la maceración se realiza a una temperatura de entre 55 y 65°C. En una forma de realización adicional, la maceración se realiza a una temperatura de 55°C. La invención no se limita sólo a los intervalos de temperatura mencionados. Según la enzima utilizada también puede seleccionarse un intervalo de temperatura, que corresponda al óptimo de temperatura de la enzima utilizada en cada caso.

El procedimiento según la invención puede comprender también una etapa, en la que la maceración descrita en el presente documento se termina mediante filtración de la disolución de reacción y/o mediante enfriamiento de la disolución de reacción. Esta terminación de la reacción, tal como se describe en el presente documento, debe entenderse como inactivación de la reacción.

En una forma de realización, la maceración (con digestión) se termina mediante filtración, pudiendo adaptarse en la filtración del macerado el tamaño de malla de los filtros usados al tamaño de los organismos que deben detectarse. En una forma de realización adicional, la filtración para terminar la reacción puede tener lugar dado el caso aplicando presión o vacío.

Tal como se ilustra en los ejemplos, puede realizarse una filtración o filtración forzada (filtración de la disolución, dado el caso aplicando presión o vacío). A este respecto, una ventaja decisiva es una ganancia de tiempo con respecto a un procedimiento sin filtración. Durante la fase de sedimentación puede observarse eventualmente una sedimentación hacia abajo y una flotación hacia arriba de material. Además, el líquido de digestión puede precipitar en forma de flóculos durante la sedimentación. El precipitado puede flotar entonces hacia arriba e impedir así una sedimentación completa de los parásitos que deben detectarse. Si esto tuviera lugar, entonces una filtración forzada tiene un efecto positivo adicional, que radica en que de este modo puede contrarrestarse este proceso de flotación. Por consiguiente tiene lugar una sedimentación completa de los parásitos que deben detectarse.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención comprende un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas en la carne, que comprende macerar (con digestión) la carne con una disolución de digestión básica, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10, que comprende una enzima (de digestión) activa en medio básico, tal como una serina endopeptidasa, teniendo lugar el control posterior, la detección posterior, el diagnóstico posterior y/o la tipificación posterior de una infestación por parásitos visualmente. Sin embargo, la detección de los parásitos dado el caso presentes puede tener lugar también mediante un control posterior, una detección posterior, un diagnóstico posterior y/o una tipificación posterior de las proteínas o moléculas de ácido nucleico parasitarias correspondientes. El término "a continuación", tal como se usa en el presente documento, se refiere a que el procedimiento según la invención comprende en primer lugar la detección y/o el aislamiento de parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne. Son sólo estos "parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos" los que, preferiblemente, se examinan/determinan a continuación con procedimientos de biología molecular o bioquímicos tal como se describe en el presente documento.

En una forma de realización, la detección de las moléculas de ácido nucleico puede tener lugar a través de una reacción PCR. A este respecto debe destacarse especialmente, que las moléculas de ácido nucleico en la medida de lo posible no deben degradarse o deben degradarse lo menos posible y permanecer lo más intactas posible durante la maceración descrita anteriormente. En una forma de realización, la detección de las moléculas de ácido nucleico se basa en la detección de secuencias específicas correspondientes, que pueden detectar inequívocamente estos parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas. El experto puede deducir secuencias adecuadas para la detección específica de secuencia a partir de bancos de datos conocidos. En una forma de realización adicional, la detección, el diagnóstico y/o la tipificación de una infestación por parásitos se basarán en métodos a base de suero o procedimientos serológicos. Estos procedimientos serológicos/inmunológicos para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas se basan, en una forma de realización, en la detección de antígenos correspondientes de estos parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas. En caso de usar anticuerpos, se forma un inmunocomplejo, que puede detectarse mediante un

procedimiento conocido por el experto. En una forma de realización adicional pueden usarse procedimientos serológicos/inmunológicos adicionales, por ejemplo procedimientos de inmunotransferencia, ELISA, RIA, SPR (resonancia de plasmón superficial) o pruebas de aglutinación, citándose en este caso sólo algunos ejemplos.

5 Tal como se describió anteriormente, en una forma de realización especial, la detección de las moléculas de ácido nucleico puede tener lugar a través de una reacción PCR. A este respecto, la amplificación de ácidos nucleicos tiene lugar mediante una reacción PCR (reacción en cadena de la polimerasa) conocida por el experto, descrita a continuación. Otros procedimientos de amplificación son, por ejemplo, reacción en cadena de la ligasa (LCR), LCR con relleno de huecos (Gap-LCR), amplificación a base de secuencia de ácido nucleico (NASBA) y amplificación mediada por transcripción (TMA). Estos procedimientos se conocen ampliamente en el estado de la técnica.

10 La técnica de la PCR se incluye, por ejemplo, en PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich, Ed. (1992); PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.*, Ed. (1990); R. K Saiki *et al.*, Science 230: 1 350 (1985) y el documento US 4.683.202, cuya divulgación se incorpora en su totalidad en el presente documento. La PCR en tiempo real se describe, por ejemplo, en los documentos EP-A-O 51 2 34, EP-A-O 640 828, EP-A-O 51 9 338 (F. Hoffmann-La Roche AG). Se ofrecen para ello sistemas comerciales, por ejemplo
15 TaqMan® (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg Township, Nueva Jersey).

El experto conoce procedimientos convencionales habituales para detectar ácidos nucleicos o puede deducir estos procedimientos de manuales convencionales (por ejemplo Sambrook, *et al.*, 2001, citado anteriormente).

20 Tal como se describió anteriormente, en una forma de realización adicional, la detección, el diagnóstico y/o la tipificación de los parásitos se basará en métodos a base de suero o procedimientos serológicos. Estos procedimientos serológicos/inmunológicos para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas, en una forma de realización preferida, se basan en la detección de antígenos correspondientes de estos parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas. En caso de usar anticuerpos, se forma un inmunocomplejo, que puede detectarse mediante un procedimiento conocido por el experto. A este respecto, se emplean, entre otros, inmunoaglutinación, inmunoprecipitación (inmuno-difusión, inmuno-electroforesis o
25 inmunofijación), técnicas de inmunotransferencia de tipo Western (por ejemplo *in situ*), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica (*in situ*), cromatografía de afinidad, inmunoanálisis enzimáticos. También pueden determinarse polipéptidos, por ejemplo, en disolución mediante procedimientos físicos, tales como por ejemplo fotometría. Son posibles procedimientos para la cuantificación de un determinado polipéptido en una mezcla debido a la unión específica, por ejemplo de anticuerpos. Los procedimientos de cuantificación y métodos de detección específicos aprovechan la especificidad de los anticuerpos, por ejemplo en procedimientos inmunohistoquímicos. Así puede determinarse, por ejemplo, la concentración, la cantidad o la presencia o la ausencia de antígenos específicos correspondientes de los parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas mediante un ensayo por
30 inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Alternativamente, también pueden realizarse procedimientos de inmunotransferencia de tipo Western y/o procedimientos colorimétricos inmunohistoquímicos. La inmunotransferencia de tipo Western combina, por ejemplo, la separación de una mezcla de proteínas mediante electroforesis y la detección específica posterior con anticuerpos. La electroforesis también puede ser multidimensional, tal como electroforesis 2D. A este respecto, los polipéptidos se separan habitualmente en la electroforesis 2D en una dimensión según su peso molecular y en la otra dirección según su punto isoeléctrico. En una forma de realización adicional, pueden usarse procedimientos serológicos/inmunológicos adicionales, por
40 ejemplo procedimientos de inmunotransferencia, ELISA, RIA, SPR (resonancia de plasmón superficial) o pruebas de aglutinación, citándose en este caso sólo algunos ejemplos que resultan conocidos para el experto. El experto conoce estos y otros procedimientos adecuados para detectar y/o determinar la cantidad/concentración de una proteína/polipéptido específico y se describen, por ejemplo, en Sambrook, *et al.*, 2001, citado anteriormente.

45 La detección, el diagnóstico y/o la tipificación de una infestación por parásitos pueden basarse en métodos a base de suero o procedimientos serológicos tal como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El término "ELISA" designa un procedimiento (ensayo) de detección inmunológico, que a diferencia del radioinmunoanálisis (RIA) no se basa en una medición de la radiactividad, sino en una reacción colorimétrica enzimática. Como el radioinmunoanálisis, el ELISA pertenece también al grupo de los procedimientos de inmunoanálisis. Ambos procedimientos resultan conocidos para el experto y se describen en el estado de la técnica.

50 El procedimiento según la invención puede utilizarse en particular para detectar parásitos del filo *Nematoda* (nematodos). En una forma de realización de la presente invención, en el caso de los parásitos formadores de cápsulas se trata de organismos, que pertenecen al género *Trichinella* (triquinas). En otra forma de realización preferida, la especie de *Trichinella* se selecciona del grupo que consiste en: *Trichinella britovi*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella nativa*, *Trichinella nelsoni* y *Trichinella spiralis*. En otra forma de realización, los parásitos no formadores
55 de cápsulas son *Trichinella pseudospiralis*. En una forma de realización adicional del procedimiento según la invención se detectan *Sarcocystis* spp. esencialmente intactas. En el caso de los organismos que deben detectarse puede tratarse de triquinas, tal como por ejemplo las especies *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella papuae* y *Trichinella zimbabwensis*.

Tal como se ilustra en los ejemplos, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica en presencia de una proteasa activa en medio básico, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10, siendo la carne que va a examinarse preferiblemente carne de animales de matanza o carne de animales para taxidermia. Tal como se usa en el presente documento, el término "carne" se refiere en particular a carne de animales de matanza con obligación de examen, resultando el término "animales de matanza con obligación de examen" conocido en general para el experto. Sin embargo, en un sentido más amplio, la carne que va a examinarse también puede proceder preferiblemente de mamíferos, peces, reptiles, aves o anfibios. Por consiguiente, la carne que va a examinarse puede proceder, por ejemplo, de cerdos, corzos, ganado vacuno, ciervos, gamuzas, alces, jabalíes, équidos, osos, zorros, nutrias, perros mapache (*Nyctereutes procyonoides*), avestruces, cocodrilos, caballos así como reses de matanza o animales de matanza, animales domésticos y animales salvajes tales como caza de pelo, caza de pluma, caza de concha, jabalíes, caza mayor, caza menor, corzos, caza de animales carnívoros, caza de animales grandes, caza de animales pequeños o también tejones. Sin embargo, la carne también puede proceder de todos los demás animales, que pueden estar infectados con parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas. La carne también puede proceder de otros animales, que son portadores de parásitos del filo *Nematoda* (nematodos), en particular portadores de triquinas, tales como *Trichinella*, o que están infectados con los mismos.

La presente invención comprende además el uso de una proteasa activa en medio básico tal como una endopeptidasa, en particular una serina endopeptidasa, en uno de los procedimientos descritos anteriormente. Por tanto, en particular, la presente invención comprende un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas en la carne, que comprende macerar (con digestión) la carne con una disolución de digestión básica, que contiene una serina endopeptidasa.

Por consiguiente, la invención se refiere también al uso de una proteasa activa en medio básico en un procedimiento descrito en el presente documento. La enzima de digestión activa en medio básico puede ser una endopeptidasa, preferiblemente una serina endopeptidasa. Esta serina endopeptidasa comprende igualmente enzimas del grupo de enzimas de las subtilisinas. La subtilisina puede seleccionarse del grupo que consiste en: Alcalase® (subtilisina Carlsberg) y Alcalase 2,5L®.

Tal como se describió anteriormente, el uso según la invención se basa en disoluciones de digestión básicas, tal como se muestra en los ejemplos, pudiendo contener esta disolución proteasas activas en medio básico, tales como serina endopeptidasas. Sin embargo, el experto conoce proteasas activas en medio alcalino/básico adicionales tales como proteasas alcalinas, tratándose en una forma de realización preferida en el caso de estas proteasas alcalinas de aminopeptidasas alcalinas (EC 3.4.11), cisteína peptidasas alcalinas (EC 3.4.22) o metalopeptidasas alcalinas (EC 3.4.24). Éstas también pueden utilizarse según la invención, haciendo referencia los ejemplos proporcionados a las serina proteasas utilizadas preferiblemente.

La presente invención comprende proteasas activas en medio alcalino/básico, tal como por ejemplo una serina endopeptidasa, tal como subtilisina/Alcalase®, en el uso en uno de los procedimientos de diagnóstico descritos en el presente documento. Por tanto, la invención se refiere igualmente a una enzima de digestión activa en medio básico, una serina endopeptidasa, una enzima del grupo de enzimas de las subtilisinas, Alcalase® (subtilisina Carlsberg) o Alcalase 2,5L® para su uso en un procedimiento de diagnóstico para la detección de una infección con parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas.

La presente invención se refiere además preferiblemente a una Alcalase® (subtilisina Carlsberg) o Alcalase 2,5L® para su uso en un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica.

Finalmente, la presente invención se refiere al uso de un kit, que comprende una disolución de digestión básica, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10, y una proteasa activa en medio básico, en particular una serina endopeptidasa descrita anteriormente, para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, que contiene por ejemplo una serina endopeptidasa. En una forma de realización preferida, el kit comprende una enzima del grupo de enzimas de las subtilisinas, en una forma de realización preferida adicional la enzima Alcalase® (subtilisina Carlsberg) o Alcalase 2,5L®. En el presente documento se describen igualmente kits, que comprenden una enzima de digestión activa en medio básico, una serina endopeptidasa, una enzima del grupo de enzimas de las subtilisinas, Alcalase® (subtilisina Carlsberg) o Alcalase 2,5L®, utilizándose estos "kits" para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne.

Las formas de realización, que se dan a conocer en relación con el procedimiento de la presente invención, son aplicables con las modificaciones necesarias también al kit de la presente invención.

El kit de la presente invención comprende ventajosamente además una disolución de digestión, que contiene opcionalmente (a) cloruro de sodio (NaCl), (b) emulsionantes de grasa, (c) tensioactivos y/o (d) adyuvantes. Los emulsionantes de grasa comprenden también, tal como se describió anteriormente, detergentes y resultan conocidos para el experto. Ventajosamente, el kit comprende además todavía tampones de reacción, disoluciones de

conservación, disoluciones de lavado y/o otros reactivos o materiales adicionales, que sean necesarios para realizar procedimientos, tal como se describe en el presente documento, para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas en la carne, que comprenden macerar la carne con una disolución de digestión básica, que contiene por ejemplo igualmente una serina endopeptidasa.

5 Además, el kit de la presente invención en una forma de realización adicional puede comprender igualmente agentes para detectar o para determinar el valor de pH básico. Tal como se describió anteriormente, el experto conoce y está familiarizado con un gran número de métodos, para determinar el valor de pH de una disolución con diferentes métodos. Por ello, el kit comprende también las formas de realización, que se dan a conocer en relación con el procedimiento de la presente invención con las modificaciones necesarias.

10 En una forma de realización adicional, el kit puede comprender una disolución de digestión que sea básica, teniendo el valor de pH de esta disolución de digestión un valor entre pH 7,3 y 10. En una forma de realización, la disolución de digestión tiene un valor de pH de entre pH 7,3 y 9. Tal como se describió anteriormente, según la invención se usa una disolución de digestión con un valor de pH de entre pH 7,3 y 10.

15 El valor de pH de la disolución de digestión es preferiblemente mayor que pH 7,5, 7,8, 8,0 u 8,5. Tal como se muestra en los ejemplos, la disolución de digestión puede tener un pH de entre pH 7,3 y 9, por ejemplo pH 8,0 o pH 8,5. Otros valores de pH de la disolución de digestión son, por ejemplo, 7,5, 7,8, 8,0, 8,5, 9,0 ó 9,5. En una forma de realización preferida adicional, según la enzima utilizada, se selecciona un intervalo de pH básico, en el que se encuentra el óptimo de pH de la enzima activa en medio básico utilizada en cada caso.

20 En una forma de realización, el kit comprende una disolución de digestión básica, siendo el emulsionante/emulsionante de grasa descrito en la misma por ejemplo Supralan UF®. Sin embargo, el emulsionante de grasa puede ser también, tal como se describió anteriormente, un detergente o comprender detergentes. Los detergentes resultan conocidos para el experto y pueden comprender los descritos anteriormente. En una forma de realización adicional, el kit de la presente invención puede contener una disolución de digestión, seleccionándose los adyuvantes descritos del grupo que consiste en: coenzimas, sustratos enzimáticos y catalizadores. En una forma de
25 realización adicional, esta disolución de digestión puede contener colorantes o agentes de coloración, con los que puede darse color a los parásitos que deben detectarse. En una forma de realización de este tipo, los parásitos de este tipo a los que se ha dado color facilitan la detección óptica/visual de los parásitos en las muestras y/o la tipificación de los parásitos.

30 El kit de la presente invención puede usarse ventajosamente entre otros para posibilitar la detección de parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende la maceración de la carne con una disolución de digestión básica, que contiene por ejemplo una serina endopeptidasa, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10.

35 Por tanto, este Kit, de acuerdo con lo anterior, puede usarse en un procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión, que contiene por ejemplo una serina endopeptidasa, que comprende opcionalmente las siguientes etapas: (a) triturar mecánicamente la carne que va a examinarse; (b) macerar la carne que va a examinarse mediante la adición de una disolución de digestión; (c) macerar con movimiento simultáneo de la mezcla de base de digestión y/o tratamiento por ultrasonidos simultáneo; (d) inactivar la maceración; (e) filtrar el macerado; y (f) controlar, detectar, diagnosticar y/o tipificar una infestación por parásitos. Tal como se describió anteriormente, la trituración mecánica y la maceración pueden realizarse al mismo tiempo. Sin embargo, la carne que va a examinarse puede
40 triturarse en primer lugar y la etapa de digestión enzimática/la maceración tiene lugar después de esto.

La producción del kit sigue preferiblemente procedimientos convencionales, que resultan conocidos para el experto en la técnica. El kit de la presente invención es preferiblemente útil en un procedimiento tal como se proporciona en el presente documento.

45 Con el procedimiento descrito en el presente documento es posible digerir las muestras en un plazo de tiempo muy corto. Una digestión de la carne que va a examinarse es posible en aproximadamente 20 min., sin limitarse a este tiempo. Esto se muestra, entre otros, en los ejemplos adjuntos. Por consiguiente, el procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne expuesto en el presente documento es claramente más rápido que el método de detección de referencia con pepsina, que requiere
50 aproximadamente 40 min.

55 El proceso completo según la invención (digestión y sedimentación) tiene una duración aproximadamente igual que el procesamiento en el aparato tricómico, de un método adicional habitual en el estado de la técnica. Sin embargo, en el aparato tricómico pueden procesarse como máximo 35 muestras por ejecución, a diferencia del procedimiento descrito en el presente documento, que puede procesarse muchas más muestras, por ejemplo 100 muestras por ejecución.

Por tanto, el procedimiento descrito en el presente documento va acompañado tanto de una ventaja temporal como de una ventaja de cantidades. Con el procedimiento descrito en el presente documento puede realizarse la

maceración con un equipamiento de laboratorio relativamente reducido. Las muestras pueden examinarse tras la reacción de digestión con el método de sedimentación conocido en el estado de la técnica con el embudo de decantación clásico.

- 5 De acuerdo con la presente invención puede realizarse una automatización para el control de triquinas racional en instalaciones a gran escala, de manera análoga al procedimiento automático conocido en el estado de la técnica con el aparato tricómico.

Con el procedimiento descrito en el presente documento los costes de material son significativamente menores. Dado que además puede procesarse una mayor cantidad de muestras en una ejecución, también es menor el despliegue de personal.

- 10 En los ejemplos descritos a continuación se utiliza una enzima del grupo de enzimas de las subtilisinas, no limitándose la invención descrita en el presente documento a esta enzima. Subtilisina es el nombre de un grupo de enzimas, que pertenece a un grupo adicional de serina proteasas/serina endopeptidasas (clasificación de enzimas categoría EC EC3.4.21) y cuya reacción catalizada es por tanto la ruptura de cadenas proteicas. A las serina proteasas/serina endopeptidasas pertenecen, entre otras, las enzimas quimotripsina (EC3.4.21.1), tripsina (EC3.4.21.4), elastasa (EC3.4.21.11), plasmina (EC3.4.21.7), trombina (EC3.4.21.5), savinasa (EC3.4.21.14) y subtilisina (EC3.4.21.62). Las subtilisinas se encuentran principalmente en bacterias del género *Bacillus* y se usan industrialmente desde hace décadas en detergentes. Un gran número de diferentes subtilisinas y enzimas similares se aíslan de bacterias del género *Bacillus*, en particular las especies *B. subtilis* (subtilisina E), *B. lentus*, *B. licheniformis* (subtilisina Carlsberg, Alcalase®), *B. amyloliquefaciens*, pero también de los mohos *Tritirachium album*,
 15 *Thermoactinomyces vulgaris*. Todos estos microorganismos se producen de manera natural en el suelo y las subtilisinas les sirven para la degradación de proteínas fuera de la célula. La enzima se conoce por el nombre de subtilisina Carlsberg y está registrada y patentada con el nombre Alcalase®. Alcalase® es una proteasa, que se utiliza para eliminar manchas a base de proteína. Se utiliza principalmente en detergentes para productos textiles y en lavavajillas. Alcalase® se produce sólo con una actividad. Se produce en forma líquida, como polvo y como
 20 producto granulado. El uso de la forma líquida se prefiere en la presente invención, dado que los polvos finos en general y los polvos finos enzimáticos en especial se consideran peligrosos para la salud. El tipo Alcalase 2.5L® utilizado se obtiene a partir de bacterias modificadas mediante ingeniería genética. Hay otros tipos de Alcalase, que se obtienen a partir de no modificadas mediante ingeniería genética. Éstos son significativamente más caros y se utilizan en productos que sólo pueden producirse a partir de organismos no modificados mediante ingeniería genética. Además, también hay los denominados tipos "Ultra", que de manera adicional están estabilizados previamente, para poder mezclarse mejor con otros tipos de enzimas. De acuerdo con lo anterior, la presente invención comprende preferiblemente subtilisinas. La presente invención comprende no sólo las subtilisinas descritas anteriormente, sino también subtilisinas adicionales, que en lo sucesivo se denominan a modo de ejemplo subtilisinas: proteinasa K; proteinasa R; proteinasa T (aislada a partir de *Tritirachium album Limber*); subtilisina DY,
 30 también subtilisina Carlsberg, subtilisina A, subtilopeptidasa A o denominada Alcalase Novo; BPN', también denominada proteinasa Nagarase, denominada Nagarase o subtilopeptidasa C; Novo, denominada también proteinasa bacteriana Novo, subtilisina B o subtilopeptidasa B; mesentericopeptidasa y termitasa. Tal como se describió anteriormente, el uso según la invención se basa en disoluciones de digestión básicas, tal como se muestra en los ejemplos, conteniendo éstas enzimas de digestión tales como serina endopeptidasas. Sin embargo,
 35 el experto conoce enzimas de digestión activas en medio alcalino/básico adicionales tales como proteasas alcalinas, tratándose, en una forma de realización preferida, en el caso de estas proteasas alcalinas de aminopeptidasas alcalinas (EC 3.4.11), cisteína peptidasas alcalinas (EC 3.4.22) o metalopeptidasas alcalinas (EC 3.4.24). También éstas pueden utilizarse según la invención, refiriéndose los ejemplos proporcionados a las serina proteasas utilizadas preferiblemente.

- 40 Tal como se comentó anteriormente y se ilustra en los ejemplos más adelante, en una forma de realización preferida, la detección de parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne se desarrolla teniendo lugar la maceración de la carne con una disolución de digestión básica, que contiene una serina endopeptidasa, con tratamiento por ultrasonidos simultáneo. Tal como se ilustra a continuación, mediante la utilización de ultrasonidos se aumenta muy claramente la velocidad de digestión. Mediante la exposición a ultrasonidos del baño es posible digerir las muestras en el plazo de aproximadamente 15 minutos. Así es posible procesar rápidamente en instalaciones a gran escala también grandes cantidades de muestras.

- 45 Tal como se ilustra en los ejemplos descritos a continuación, en una forma de realización de la presente invención, puede usarse agua del grifo normal. En el baño de ultrasonidos se estableció que tiene lugar una "precipitación" blanca, en cuyo caso se trata de cal. En caso de que la evaluación microscópica se viera alterada por la precipitación de cal, en una forma de realización preferida, puede recurrirse para el baño de digestión a agua similar a destilada.

- 50 En una forma de realización preferida adicional, en la reacción de digestión se prefiere un intervalo de pH de desde pH 7,3 hasta 9, un intervalo de pH, en el que se encuentra el óptimo de la Alcalase®. La temperatura preferida con la mejor actividad se encuentra a aproximadamente 55°C. Dado que al introducir las muestras en el baño de digestión se produce un enfriamiento, en una forma de realización adicional, puede trabajarse con una temperatura

de partida inicial de aproximadamente 60°C. Tal como ya se describió anteriormente, según la invención se usa una disolución de digestión con un valor de pH de entre pH 7,3 y 10.

5 El valor de pH de la disolución de digestión es preferiblemente mayor que pH 7,3, 7,5, 7,8, 8,0 u 8,5. Tal como se muestra en los ejemplos, la disolución de digestión puede tener un valor de pH de entre pH 7,3 y 9, por ejemplo pH 8,0 o pH 8,5. Otros valores de pH de la disolución de digestión son, por ejemplo, 7,5, 7,8, 8,0, 8,5, 9,0 ó 9,5. En una forma de realización preferida adicional, según la enzima utilizada, se selecciona un intervalo de pH básico, en el que se encuentra el óptimo de pH de la enzima activa en medio básico utilizada en cada caso.

10 El término "baño", tal como se usa en el presente documento, comprende la disolución de maceración inclusive todos los aditivos. Por el término "razón de baño", tal como se usa en el presente documento, se entiende la razón en peso de la disolución de maceración con respecto a la cantidad de carne que debe digerirse.

15 El término "razón de baño", tal como se usa en el presente documento, comprende también que mediante la utilización de más enzimas se acelera la velocidad de digestión. A este respecto, la razón de carne (cantidad de muestra que debe digerirse) con respecto a enzima es decisiva. En caso de una razón de baño demasiado reducida de carne con respecto a líquido de digestión durante la adición de muestras (temperatura ambiente) al baño de digestión (60°C) se produce un enfriamiento demasiado intenso del baño.

En una forma de realización preferida adicional, el procedimiento descrito en el presente documento se realiza con movimiento del baño durante la operación de digestión, dado que la carne batida en parte sedimenta y en parte flota en el baño.

20 Tal como se comentó anteriormente, en una forma de realización de la presente invención, también se usan adicionalmente emulsionantes, tales como emulsionantes de grasa, dado que con las muestras de carne también se introduce siempre tejido graso en el baño de digestión. El porcentaje de grasa es claramente mayor en animales viejos que en animales jóvenes. Sin el uso de emulsionantes de grasa, esta grasa flota tras la digestión en forma de puntos de grasa hacia la superficie del agua. Dado que esta grasa queda retenida en el filtro durante la filtración forzada, puede perjudicar el examen bajo el microscopio. Tal como se ilustra en los ejemplos expuestos a
25 continuación, mediante la utilización de emulsionantes de grasa se disuelve la grasa presente. Por consiguiente, en una forma de realización adicional del procedimiento descrito en el presente documento y de los usos descritos en el presente documento sin embargo también puede estar contenido un emulsionante/emulsionante de grasa en la disolución de maceración/la disolución de digestión básica, aunque las disoluciones de digestión básicas según la invención, tal como se muestra en los ejemplos, no tienen que contener un emulsionante de grasa. Por consiguiente, según la invención pueden utilizarse disoluciones de digestión, para evitar las propiedades negativas que pueden
30 aparecer del porcentaje de grasa de la carne que va a examinarse. La utilización adicional de emulsionantes, tal como emulsionantes de grasa, en los procedimientos y usos según la invención y también en los kits tiene la ventaja de que el procedimiento según la invención no se ve obstaculizado, si aparecieran estos porcentajes de grasa. Por consiguiente, la presente invención comprende también con respecto a los ejemplos proporcionados en el presente
35 documento una disolución de digestión básica, que contiene además un emulsionante/emulsionante de grasa. Los emulsionantes/emulsionantes de grasa que se utilicen deben ser compatibles con la enzima.

40 Como emulsionante/emulsionante de grasa puede utilizarse un etoxilato de alcohol graso. En una forma de realización adicional se utiliza el etoxilato de alcohol graso con el nombre de producto "Supralan UF®" (número de producto 2209) de la empresa Zschimmer y Schwarz de Lahnstein/Alemania. Supralan UF® procede del sector de la curtiduría y tiene capacidades de emulsionamiento muy buenas ya a concentraciones reducidas. Se utiliza como agente desengrasante para artículos con un contenido de grasa natural muy elevado y desde el punto de vista químico es un etoxilato de alcohol graso, que es líquido, incoloro y no iónico.

45 Por consiguiente, el kit puede contener una proteasa activa en medio activo, por ejemplo, una serina endopeptidasa, tal como por ejemplo subtilisina/Alcalase®. El kit puede contener además una disolución de digestión básica. El kit puede contener además un emulsionante/emulsionante de grasa/detergente. Por consiguiente, un kit de la presente invención puede contener una disolución de digestión básica descrita en el presente documento y una enzima de digestión activa en medio básico descrita en el presente documento. Un kit de la presente invención puede contener una disolución de digestión básica descrita en el presente documento y un detergente o emulsionante/emulsionante de grasa descrito en el presente documento. Además, un kit puede contener una enzima de digestión activa en medio básico descrita en el presente documento y un detergente o emulsionante/emulsionante de grasa descrito en el presente documento. Un kit adicional de la presente invención puede contener una disolución de digestión básica descrita en el presente documento, una enzima de digestión activa en medio básico descrita en el presente documento y un detergente o emulsionante/emulsionante de grasa descrito en el presente documento. Por
50 consiguiente, un kit de la presente invención puede contener componentes individuales como combinaciones de
55 estos componentes, usándose el kit para realizar el procedimiento según la invención.

La disolución de digestión básica, que se utiliza en el procedimiento según la invención, puede contener también sales, tal como por ejemplo NaCl (cloruro de sodio). En la preparación de huesos con enzimas se utiliza en la mayoría de los casos NaCl (sal). Esto impide la formación de jabones de cal. A este respecto, el NaCl sirve también como activador para la mayoría de las enzimas. Se recomienda una cantidad de utilización de 10 - 20 g por litro,

según la dureza del agua (de: Knochenpräparation, Handbuch für Praktiker von Niederklopper/Troxler). El término “jabones de cal” tal como se usa en el presente documento, se refiere a sales de calcio o de magnesio difícilmente solubles en agua, por regla general de ácidos grasos. Se forman con el uso de jabones en agua dura. Mediante la formación de estos jabones de cal se reduce el efecto de lavado, dado que disminuye la cantidad de jabón activa y los jabones de cal se depositan como impureza sobre las superficies que deben lavarse. Puede contrarrestarse la formación de jabones de cal con agentes de ablandamiento, que se unen a los iones calcio y magnesio. Debido a dichos problemas, los productos de limpieza utilizados hoy en día en el entorno doméstico contienen en la práctica ningún jabón o pocos jabones en el sentido clásico, sino otras sustancias detergentes (tensioactivos). Los agentes seleccionados por los fabricantes como sustitutos de los “verdaderos” jabones forman de menos a ningún jabón de cal y por tanto no conducen a una floculación y un peor efecto de lavado. La formación de cantidades menores de jabones de cal se aprovecha en los detergentes modernos para inhibir un desarrollo excesivo de espuma. El jabón de cal se genera a partir de las grasas animales presentes en las muestras. En una forma de realización especial de la presente invención, en todos los ejemplos descritos a continuación se utilizan 20 g de sal/litro de baño, pudiendo usarse también otras concentraciones de sal.

El procedimiento descrito en el presente documento también puede comprender una etapa, en la que la maceración descrita en el presente documento se termina mediante filtración de la reacción o mediante enfriamiento de la reacción. La maceración puede terminarse tanto mecánica como (bio)químicamente. La terminación consiste, por ejemplo, en filtración o enfriamiento. Esta terminación de la reacción, tal como se describe en el presente documento, debe entenderse como inactivación de la reacción. Esto puede ser importante, dado que las triquinas en caso de un tiempo de residencia demasiado largo en el baño de digestión también pueden verse dañadas. Por esto puede detenerse el proceso tras el tiempo de digestión planeado. En una forma de realización preferida, esto puede tener lugar o bien mediante una filtración inmediata o bien mediante un enfriamiento, por ejemplo dilución con agua fría o una disolución de NaCl al 0,1%.

El término “fascia”, tal como se describe en el presente documento, designa los componentes de partes blandas del tejido conjuntivo, que atraviesan todo el cuerpo como una red de tensión circundante y de unión. A éstos pertenecen todos los tejidos conjuntivos fibrosos de colágeno, en particular cápsulas de articulaciones y de órganos, aponeurosis, septos musculares, ligamentos, tendones, retináculos (los denominados “frenos” por ejemplo en los pies), así como las “verdaderas fascias” en forma de capas de tejido conjuntivo firmes planas, tales como la fascia plantar en la planta del pie. Preferiblemente, tal como se comentó anteriormente y se ilustra en los ejemplos siguientes, es necesario más tiempo hasta que las fascias se han disgregado en el baño de maceración. Si la disgregación de las fascias no tiene lugar de manera completa, en una forma de realización de esta invención, el baño de maceración puede tamizarse a través de un filtro grueso.

Las figuras muestran:

Figura 1: Disolución de digestión en un embudo de decantación tras 10 min. de fase de sedimentación. Se observa una precipitación floculante. El precipitado flota hacia la superficie e impide así una sedimentación completa de los parásitos que deben detectarse (véase el ejemplo 3, ensayos 1 y 2). En estos ensayos no se utilizó ningún emulsionante de grasa Supralan UF®.

Figura 2: Larvas a modo de ejemplo en una placa de Petri tras la digestión con Alcalase®, tal como se describe en el ejemplo 4.1.

Figura 3: Larvas a modo de ejemplo en una placa de Petri tras la digestión con Alcalase®, tal como se describe en el ejemplo 4.1.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Material y métodos

Material:

máquina trituradora de carne Alexanderwerk 5 para la trituración gruesa del material de muestra (tamaño de orificio 4 mm)

vaso de precipitados de 1200 ml

vaso de precipitados de 200 ml

tubos de ensayo

frascos de cuello ancho de PVC 100 ml

batidora Philips Cucina HR 1350/1351/80/BC con cuchilla insertada

aparato de ultrasonidos del tipo Bandelin Sonorex RK 1028H con baño de agua controlado por un termostato

agitador magnético Pyro-Mag Stir n.º de cat. 34534-200

báscula digital Mettler PP200

termómetro digital Oregon Scientific SA880SSX

5 cronómetro Sportcount Combination

tiras de medición de pH Macherey - Nagel 92122

embudo de decantación cónico, sin división, con machos de PTFE, de 1000 ml Lenz-Laborglas, n.º de art.: 4.0041.7 con soporte

filtro grueso de tipo tamiz para café, tamaño de malla estimado de 0,8 mm

10 jeringuilla de 20 ml

agua de grifo

agua similar a destilada

enzima subtilisina Carlsberg (Alcalase®)

enzima papaína 6.000 USP U/mg (= 1,18 mU de BAPA/mg)

15 emulsionante poliglicoléter de alcohol graso (Supralan UF®)

carbonato de sodio (sosa)

Método:

Se tritura de manera gruesa la muestra de carne que va a examinarse de 100 g en la máquina trituradora de carne. Se llena un vaso de precipitados de 1200 ml con 500 ml de agua similar a destilada precalentada hasta 62°C. Se añaden 5 g de NaCl así como de 5 a 20 g de subtilisina Carlsberg. Después se añade la muestra de carne. Le sigue un mezclado completo y una trituración adicional con la batidora durante 4 por 2 segundos. La muestra así preparada o bien se introduce en el baño de agua expuesto a ultrasonidos precalentado hasta 62°C y conectado o bien se procesa adicionalmente en el agitador magnético. Mediante la adición de carbonato de sodio se ajusta el valor de pH comprobando por medio de tiras de medición de pH a 8,5 +/- 0,2. Tras el tiempo de incubación deseado se trasvasa el baño a través de un tamiz grueso a un embudo de decantación. Se detiene el proceso mediante la adición de disolución fría de NaCl al 0,1% hasta un volumen total de 1000 ml. Previamente se había usado la disolución de NaCl como disolución de lavado para el recipiente de reacción y el filtro grueso, para no perder nada de material de muestra. Tras un tiempo de sedimentación de 10 min. se recoge el sedimento con un 20% del líquido en un vaso de precipitados de 200 ml. Se trasvasa a su vez el contenido del vaso de precipitados a un embudo de decantación y se completa con 400 ml de disolución fría de NaCl al 0,1%. Tras una segunda sedimentación de 10 min. se recoge a su vez el sedimento con 100 ml del líquido en un tubo de ensayo. Tras una tercera sedimentación de 10 min. adicionales en el tubo de ensayo se succiona el líquido restante hasta 20 ml con una jeringuilla. Se completa el sedimento restante con disolución de NaCl hasta 50 ml y se examina en el laboratorio del Instituto de parasitología veterinaria en Berna para determina la presencia y la cantidad de larvas de triquinas.

35 En ensayos seleccionados se añadieron además simultáneamente con la serina proteasa 4 g del emulsionante de grasa Supralan UF®.

Resultados:

I. En un ensayo, con 20 g de subtilisina Carlsberg/l en un baño expuesto a ultrasonidos a 60°C, valor de pH 8,5 y 10 g de NaCl/l, con una incubación durante 30 min., pudieron detectarse triquinas (digeridas superficialmente). El ADN de las triquinas todavía podía identificarse en la PCR, lo que es una condición previa indispensable para el diagnóstico y la tipificación.

II. En un ensayo adicional se completó una muestra con una cantidad conocida de parásitos con diafragma de cerdas madre hasta una cantidad de prueba de 100 g, a continuación se paso a través de una máquina trituradora de carne y se batió en 500 ml de agua. Añadiendo 5 g de NaCl, 20 g de subtilisina Carlsberg y 4 g de Supralan UF® se llevó el conjunto hasta una temperatura de reacción de 62°C y se ajustó con sosa a un valor de pH de 8,5. Tras 45 40 min. en el agitador magnético ya sólo podían reconocerse pocos restos de fascias a simple vista.

EJEMPLO 2: Ensayos de digestión comparativos con muestras contaminadas con triquinas con las enzimas Alcalase® y papaína bajo la influencia de ultrasonidos o sin movimiento del baño

ES 2 440 556 T3

Material de muestra: ratón contaminado con triquinas, congelado.

Alcalase® = subtilisina Carlsberg (obtenida de *Bacillus licheniformis*)

enzima papaína 6.000 USP U/mg (= 1,18 mU de BAPA/mg)

- 5 Se sedimentaron las muestras digeridas en un vaso 3x durante como mínimo 10 min. y en cada caso se succionaron aproximadamente 4/5 del baño con cuidado con una jeringuilla. A continuación se completó el recipiente en cada caso con una disolución de NaCl al 0,1%. La evaluación de las muestras tuvo lugar en la Universidad de Berna, Instituto de parasitología.

Ensayo 1

Origen del material de muestra: parte derecha del pecho

Condiciones de ensayo: Alcalase®, en estufa de desecación (= sin movimiento del baño); 60°C, pH 8,5,

10 g de sal/litro de agua,

20 g de Alcalase®/litro de agua

Tiempo de reacción: 5,5 horas

La maceración se realizó en un recipiente de PVC de 50 ml.

Resultado: triquinas detectables (todavía intactas, parcialmente aún encapsuladas), también presentes todavía fibras musculares; ADN de las triquinas todavía detectable.

Ensayo 2

Origen del material de muestra parte trasera izquierda

Condiciones de ensayo: Alcalase®, expuesta a ultrasonidos; 60°C, pH 8,5,

10 g de sal/litro de agua

20 g de Alcalase®/litro de agua

Tiempo de reacción: 0,5 horas

La maceración se realizó en un recipiente de PVC de 50 ml.

Resultado: triquinas detectables (digeridas superficialmente), líquido muy transparente; ADN de las triquinas todavía detectable.

10 Ensayo 3

Origen del material de muestra: parte trasera derecha

Condiciones de ensayo: papaína, expuesta a ultrasonidos, muestra cocida previamente; 40°C, pH 8,

10 g de sal/litro de agua

5 g de papaína/litro de agua

Tiempo de reacción: 0,5 horas

La maceración se realizó en un recipiente de PVC de 50 ml.

Resultado: ninguna triquina detectable.

EJEMPLO 3: Ensayos de digestión comparativos con muestras contaminadas con triquinas con la enzima Alcalase®

Material de muestra: Para todos los ensayos siguientes se mezclaron en cada caso aproximadamente 10 g de carne de caballo o cerdo con en cada caso 40 triquinas vivas (carne contaminada con triquinas). Se sedimentaron las

ES 2 440 556 T3

muestras digeridas en un embudo de decantación 3x durante como mínimo 10 min. y en cada caso se vació aproximadamente 1/5 del baño en un vaso. Se completaron las muestras en cada caso con una disolución de NaCl al 0,1%. La evaluación de las muestras tuvo lugar en la Universidad de Berna, Instituto de parasitología.

Ensayo 1

Material de muestra: carne de caballo contaminada con triquinas; muestra de aproximadamente 10 g, más aproximadamente 90 g de diafragma de cerdo viejo (total 100 g de carne), trituración de la carne mediante máquina trituradora de carne, a continuación se bate en 500 ml de agua similar a destilada a 62°C.

Mezcla base de digestión: de manera análoga al ensayo 1: (razón carne, agua 1:5), 5 g de sal, 20 g de Alcalase®, sosa a aproximadamente pH 8.5 (valor de pH al inicio de aproximadamente 10), 4 g de Supralan UF®.

Condiciones de reacción tales como en el ensayo 1, sin embargo la incubación no tuvo lugar en un baño expuesto a ultrasonidos, sino en un agitador magnético. De este modo se consiguió un movimiento intenso del baño. (nota: en el método de pepsina es una variante autorizada mover intensamente las muestras por medio de un agitador magnético).

Tiempo de reacción: 40 min. en un agitador magnético

Resultado: pocos restos de fascias, comparable con el ejemplo 3, ensayo 8; resultado muy fiable: encontradas 32 de 40 triquinas. A diferencia de una digestión convencional con pepsina las triquinas no han sobrevivido a la digestión; esto tiene la ventaja de que las muestras ya no son infecciosas.

5 Ensayo 2

Material de muestra: carne de cerdo contaminada con triquinas; muestra de aproximadamente 10 g, más aproximadamente 90 g de diafragma, cerdo viejo (total 100 g de carne). Trituración de la carne mediante máquina trituradora de carne, a continuación se bate en 500 ml de agua similar a destilada a 62°C.

Mezcla base de digestión: (razón carne, agua 1:5), 5 g de sal, 5 g de Alcalase®, sosa a aproximadamente pH 8,0.

Tiempo de reacción: 30 min. con tratamiento por ultrasonidos simultáneo.

Resultado: 2 triquinas detectables, éstas estaban intactas y no estaban digeridas superficialmente.

Puede observarse una sedimentación hacia abajo y una flotación de material hacia arriba. Esto explica porqué la sedimentación no es satisfactoria. El precipitado flota hacia arriba e impide así una sedimentación completa de los parásitos que deben detectarse. Una filtración forzada (filtración de la disolución, dado el caso aplicando presión o vacío) puede contrarrestar esto y puede utilizarse al aparecer un precipitado.

EJEMPLO 4: Validación del método según la invención por el Instituto de parasitología de la Universidad de Berna

Material

báscula Mettler Toledo, modelo PG2002-S

10 compresor (vidrios de compresión), compuesto por dos plaquetas de vidrio que pueden presionarse una contra otra
batidora Waring Commercial Blender

vaso de precipitados de 125 ml

tira indicadora de pH Merck: Alkalit pH 7,5-14

- agitador magnético inclusive sonda de temperatura IKA RCT basic
- filtro grueso de tipo tamiz de café, tamaño de malla estimado de 0,8 mm
- embudo de decantación
- tubos de centrifuga de 10 ml
- 5 placa de de Petri
- lupa estereoscópica Leica MS5, 40 aumentos
- aparato de filtración a vacío de Duranglas, diámetro de filtro de 45-50 mm
- membrana de filtro de 14,0 micrómetros GE Water & Process Technologies, n.º de cat. K14CP05000
- bomba con chorro de agua
- 10 agua de grifo
- NaCl
- enzima subtilisina Carlsberg (Alcalase®)
- emulsionante poliglicoléter de alcohol graso (Supralan UF®)
- carbonato de sodio (sosa)
- 15 EJEMPLO 4.1: Ensayos de digestión comparativos con muestras contaminadas con triquinas con la enzima Alcalase® en comparación con pepsina
- Realización del ensayo: Se comprime un trozo de carne de ratón, infectada con triquinas en un compresor y se determina el número de larvas. A esta muestra se le añaden 25 g de diafragma de cerdas madre y se bate en la mezcladora. Se calientan 125 ml de H₂O en el vaso de precipitados hasta 55°C (razón de carne con respecto a agua 1:5). Se pasa la carne batida al agua calentada y se añaden 2 g de NaCl, 0,5 g de bicarbonato de sodio y 5 ml de Alcalase®. Con una tira indicadora de pH se comprueba el valor de pH (objetivo de pH 8 a 8,5). Incubación a 55°C en el agitador magnético con agitación intensa (remolino central profundo). Se comprueba la temperatura durante todo el tiempo por medio de una sonda. Tras el tiempo de incubación de 20 min. se trasvasa el baño a través del tamiz al embudo de decantación. Se enjuaga el vaso con 125 ml de H₂O y se pasa el contenido igualmente a través del tamiz al embudo de decantación, se sedimenta 30 min. y se vacían 8 ml del sedimento en un tubo de centrifuga, entonces se sedimenta de nuevo 15 min. Se succionan los 6 ml superiores del contenido del tubo de centrifuga con una pipeta y se examinan al microscopio los 2 ml restantes en una placa de Petri bajo la lupa estereoscópica con 40 aumentos.
- 20
- 25
- 30 En paralelo a esto se realiza en cada caso la digestión convencional con pepsina con los mismos aparatos. Se pesa el residuo sobre el tamiz. Los ensayos se realizan siempre según el mismo esquema por 3 personas distintas. En cada caso dos personas distintas examinan las placas de Petri. Fuente de *Trichinella*: ratón infectado con *T. spiralis*.
- Resultados:
- Duración del examen: digestión con Alcalase® aproximadamente 70 min., digestión con pepsina aproximadamente 90 min.
- 35 La Alcalase es aproximadamente 20 min. más rápida, dado que la digestión necesita 20 min., en el caso de la pepsina 40 min.
- Residuo sobre el tamiz en ambos métodos aproximadamente el 2%
- Digestión con Alcalase: floculación de material en la disolución de digestión, éste se hunde en parte y flota en parte en nubes en el embudo de decantación sin sedimentar.
- 40 Transparencia del sedimento peor en la Alcalase® que en la pepsina. En la Alcalase® pueden verse más fibras pequeñas y muy pequeñas, en la pepsina trozos más bien grandes, pero en cambio muy pocos.
- Número de larvas encontradas: en la digestión con pepsina el 90-95%, en la digestión con Alcalase el 25-50%
- Morfología de las larvas: tras la digestión con pepsina larvas vivas, tras la digestión con Alcalase larvas fuertemente enrolladas sin movilidad visible. Los esticocitos pueden verse mejor en la digestión con pepsina.
- 45 Ejemplo 4.1.1: Digestión paralela

Se mezclan 25 g de carne de cerdo con 1 trozo de musculatura de ratón con 50 larvas.

Pepsina: se encontraron 49 larvas. Alcalase®: se encontraron 19 larvas.

EJEMPLO 4.2: Ensayos de digestión con muestras contaminadas con triquinas con filtración forzada posterior

- 5 Se supone que la mala sensibilidad puede atribuirse a una sedimentación insuficiente. Por este motivo se realizan los ensayos de manera análoga a los ensayos descritos en el ejemplo 4.1, sin embargo se filtra de manera forzada el líquido de digestión en un aparato de filtración con una membrana de filtración de 14,0 micrómetros con ayuda de una bomba de vacío con chorro de agua.

Resultados:

Pueden reconocerse algunas larvas sobre la membrana de filtración.

- 10 EJEMPLO 4.3: Ensayos de digestión con muestras contaminadas con triquinas: combinación de sedimentación y filtración forzada

Debido a la escasa visibilidad de los ensayos descritos en el ejemplo 4.2 se decide realizar una combinación de sedimentación y filtración forzada.

- 15 Consideración: Cuando en primer lugar tiene lugar una etapa de sedimentación, debería haber menos material en el sobrenadante y de este modo se mejorará la visibilidad de la membrana de filtración. Además se retoma de nuevo el producto Supralan UF® en los ensayos. No tiene lugar ninguna comparación con la digestión con pepsina.

Fuente de *Trichinella*: ratón infectado con *T. britovi*.

Ensayo 1

- 20 Se comprime un trozo de carne de ratón infectado con triquinas en un compresor y se determina un número de aproximadamente 42 larvas. A esta muestra se le añaden 13 g de carne de caballo (lengua) y se bate en la mezcladora. Se calientan 125 ml de H₂O en un vaso de precipitados hasta 55°C (razón de carne con respecto a agua de aproximadamente 1:10). Se pasa la carne batida al agua calentada y se añaden 2 g de NaCl, 0,5 g de bicarbonato de sodio, 5 ml de Alcalase® y 1 ml de Supralan UF®. Con una tira indicadora de pH se comprueba el valor de pH (objetivo pH de 8 a 8,5). Incubación a 55°C en un agitador magnético con agitación intensa (remolino central profundo), durante 20 min. Se comprueba la temperatura durante todo el tiempo por medio de una sonda.
- 25 Tras el tiempo de incubación se trasvasa el baño a través del tamiz al embudo de decantación. Se enjuaga el vaso con 125 ml de H₂O y se añade el contenido igualmente a través del tamiz al embudo de decantación, se sedimenta 30 min., se vacían 8 ml del sedimento en tubos de centrifuga y se sedimenta de nuevo 15 min. Se succionan los 6 ml superiores del contenido del tubo de centrifuga con una pipeta y se examinan al microscopio los 2 ml restantes en
- 30 una placa de Petri bajo la lupa estereoscópica a 40 aumentos. Se extraen los sobrenadantes del embudo de decantación y del tubo de centrifuga con ayuda de una bomba de vacío con chorro de agua a través del filtro.

Resultado:

En la placa de Petri 42 larvas, en el filtro 3 larvas; buena visibilidad de la placa de Petri, el filtro todavía es difícil de ver, pero es claramente mejor que en los ensayos con filtración de toda la disolución de digestión.

- 35 Ensayo 2

De manera análoga al ensayo 1, excepto: se determinan 10 larvas en el compresor y 17 g de diafragma de cerdas madre en lugar de carne de caballo.

Resultado

En la placa de Petri 10 larvas. Filtro desgarrado por vacío demasiado fuerte.

- 40 Ensayo 3

De manera análoga al ensayo 2, excepto porque se determinan 20 larvas en el compresor y 18 g de diafragma de cerdas madre.

Resultado

En la placa de Petri 20 larvas. No se realiza ninguna etapa de filtración.

- 45 En los 3 ensayos la digestión es claramente mejor desde la adición de Supralan UF®, y de este modo pueden observarse bajo el microscopio claramente menos restos de fibras, que alteran el examen. La sedimentación funciona desde la utilización de Supralan UF®.

Análisis y comentario con respecto a los ejemplos 3, 4.1 y 4.2

5 Gracias al análisis de los ensayos puede reconocerse que puede utilizarse el emulsionante/emulsionante de grasa Supralan UF®, en caso de que se produzcan las sedimentaciones o precipitaciones descritas. Por tanto, la utilización de un emulsionante/emulsionante de grasa puede mejorar el resultado con respecto a una mezcla de base sin emulsionante/emulsionante de grasa o facilitar adicionalmente la detección.

EJEMPLO 4.4: Ensayos de digestión con muestras contaminadas con triquinas: comparación de digestión con Alcalase® con digestión con pepsina mediante muestras contaminadas con triquinas de diferente origen

10 Objetivo: detectar que con la digestión con Alcalase® puede alcanzarse al menos la misma sensibilidad que con la digestión con pepsina. Esto con carne de cerdos, de jabalí y de caballo y para las tres especies de *Trichinella T. spiralis*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis*.

Principio: mezclas de base paralelas de Alcalase® y pepsina, diferentes cargas de larvas.

Los ensayos se realizan de manera análoga a los ensayos 1 a 3, tal como se describen en el ejemplo 5.3, pero con diferentes cargas de larvas.

Razón de carne con respecto a agua de aproximadamente 1:10.

15 Material:

Lengua de caballo, diafragma de cerdo y jabalí

Larvas de *T. spiralis*, *T. britovi* y *T. pseudospiralis*

Resultados:

Los resultados se resumen en la tabla siguiente.

20

Muestra	Alcalase				Pepsina			
	larvas añadidas	larvas detectadas	%	residuo de tamizado (g)	larvas añadidas	larvas detectadas	%	residuo de tamizado (g)
<i>T. spiralis</i> /cerdo	10	7	70	0,01	11	10	91	0,45
<i>T. spiralis</i> /cerdo	11	8	72	0,15	10	10	100	0,33
<i>T. spiralis</i> /cerdo	24	20	83,3	0,4	20	16	80	0,63
<i>T. spiralis</i> /cerdo	20	19	95	0,56	21	21	100	0,05
<i>T. spiralis</i> /cerdo	4	3	75	0,2	3	3	100	0,57
<i>T. spiralis</i> /cerdo	3	3	100	0,67	4	4	100	0,01
<i>T. spiralis</i> /caballo	9	7	77,8	2,4	9	4	44,4	0,3
<i>T. spiralis</i> /caballo	4	2	50	0,67				
<i>T. spiralis</i> /jabali	7	7	100	1	11	9	81,8	0,26
<i>T. spiralis</i> /jabali	3	3	100	0,46	4	3	75	0,64
<i>T. pseudospiralis</i> /cerdo	3	1	33,3	0,24	3	1	33,3	2,4
<i>T. pseudospiralis</i> /cerdo	8	8	100	0,9	6	1	16,7	0,9
<i>T. britovii</i> /cerdo	10	10	100					
<i>T. britovii</i> /cerdo	20	20	100					
<i>T. britovii</i> /caballo*	40	42	100					

PCR con larvas de *T. spiralis* y *T. pseudospiralis* tras la digestión con Alcalase® de los ensayos anteriores han funcionado correctamente.

(*) Debido a la dificultad de la determinación del número de larvas en el compresor puede ser que el número de larvas encontradas, tal como en el ensayo de *T. britovii*/caballo, debido a un error de recuento, sea mayor que el número de larvas añadidas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende macerar la carne con una disolución de digestión básica, que contiene proteasas activas en medio básico, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10.
- 5 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enzima de digestión es una serina endopeptidasa.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, que comprende las etapas de:
 - (a) triturar mecánicamente la carne que va a examinarse;
 - (b) macerar la carne que va a examinarse mediante la adición de una disolución de digestión;
 - (c) inactivar la maceración;
 - 10 (d) filtrar el macerado; y
 - (e) controlar, detectar, diagnosticar y/o tipificar una infestación por parásitos.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la razón de carne/disolución de digestión es preferiblemente de 1:5, 1:10 ó 1:20.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la serina endopeptidasa es preferiblemente una enzima del grupo de enzimas de las subtilisin.
- 15 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la subtilisina se produce de manera recombinante o no recombinante y/o se selecciona del grupo que consiste en: Alcalase® (subtilisina Carlsberg) y Alcalase 2,5L®.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la disolución de digestión contiene NaCl y/o contiene opcionalmente emulsionantes de grasa, tensioactivos y/o adyuvantes.
- 20 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el emulsionante de grasa es Supralan UF®.
9. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que los adyuvantes se seleccionan del grupo que consiste en coenzimas, sustratos enzimáticos y catalizadores.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la maceración se realiza con tratamiento por ultrasonidos simultáneo, con movimiento simultáneo y/o agitación simultánea con un agitador magnético y/o a una temperatura de entre 55°C y 65°C.
- 25 11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la inactivación de la maceración se termina mediante filtración de la reacción o mediante enfriamiento de la reacción.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que en la filtración del macerado se adapta el tamaño de malla de los filtros usados al tamaño de los organismos que deben detectarse.
- 30 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el control, la detección, el diagnóstico y/o la tipificación de una infestación por parásitos tienen lugar visualmente.
14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 13, en el que los parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas pertenecen al filo *Nematoda* (nematodos) y/o al género *Trichinella* (triquinas).
- 35 15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la especie de *Trichinella* se selecciona del grupo que consiste en *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella papuae* y *Trichinella zimbabwensis*.
16. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la carne que va a examinarse se selecciona del grupo que consiste en animales de matanza, animales domésticos, animales salvajes y animales para taxidermia.
- 40 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la carne que va a examinarse de animales de matanza, animales domésticos, animales salvajes o de los animales para taxidermia se selecciona de carne de cerdo, jabalí, oso, corzo, ciervo, gamuza, alce, caballo, zorro, nutria, perro mapache, tejón, avestruz y cocodrilo.
18. Uso de una proteasa activa en medio básico en uno de los procedimientos según una de las reivindicaciones 1 a 17.
- 45 19. Uso según la reivindicación 18, en el que la proteasa activa en medio básico es una endopeptidasa,

preferiblemente una serina endopeptidasa.

20. Uso según la reivindicación 19, en el que la serina endopeptidasa es una enzima del grupo de enzimas de las subtilisinas.
- 5 21. Uso según la reivindicación 20, en el que la subtilisina se selecciona del grupo que consiste en: Alcalase® (subtilisina Carlsberg) y Alcalase 2,5L®.
22. Uso de un kit para detectar parásitos formadores de cápsulas o no formadores de cápsulas esencialmente intactos en la carne, que comprende una disolución de digestión básica y una proteasa activa en medio básico, teniendo la disolución de digestión un valor de pH de entre pH 7,3 y 10.

Figura 1.



Figura 2.

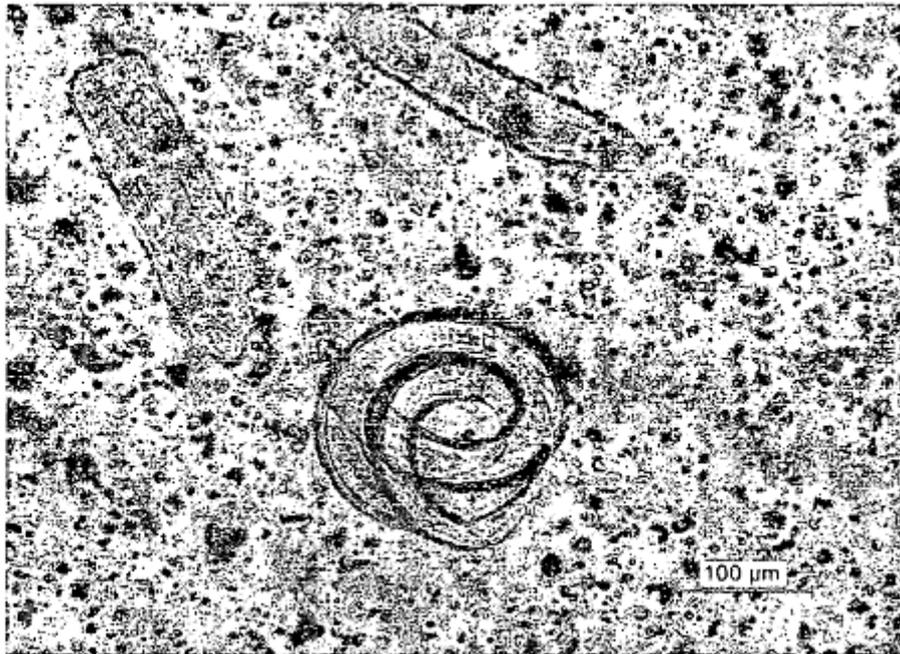


Figura 3.

