

IDENTIFICACIÓN DEL ORIGEN DE ESPECIE ANIMAL EN CARNE FRESCA UTILIZANDO INMUNODIFUSIÓN DOBLE^a

José Arturo García Macías^b
Gilberto Enrique Erosa de la Vega^c
Cristian Prieto^d
Francisco Alfredo Núñez González^b

RESUMEN

García MJA, Erosa VGE, Prieto C, Núñez GFA. *Téc Pecu Méx* 2000;38(3)231-237. Se estandarizó la técnica de inmunodifusión doble (ID) para la identificación del origen de la especie animal en carne fresca. Este antisuero resultó ser lo suficientemente específico y potente, para detectar un nivel mínimo de contaminación del 5% de carne fresca de equino en mezclas con carne de res. Así mismo, para determinar la frecuencia de venta sin autorización de carne de equino, se realizó un muestreo en 15 carnicerías de la ciudad de Chihuahua, las cuales fueron divididas en tres estratos: I) cuatro selectas (n= 40); II) cuatro comerciales (n=40) y III) siete populares (n= 70). De un total de 150 muestras, la frecuencia de positividad a carne de equino fue de 33, representando el 22%; todas las muestras positivas se encontraron en el estrato III, que representaron un 47% del total de muestras recolectadas en el mismo. El número de carnicerías positivas a la venta de carne de equino sin autorización fue de cuatro, siendo el 26.6% del total de las carnicerías muestreadas. De los resultados obtenidos se concluye que es frecuente la venta de carne de equino por la de bovino, y que la técnica de ID es apropiada para la identificación de especies en carne fresca.

PALABRAS CLAVE: Carne, Equino, Bovino, Porcino, Adulteración, Inmunodifusión doble.

Los avances en la tecnología y en el procesamiento de la carne han conducido a una mayor utilización de ésta en forma deshuesada, lo cual ha facilitado también la utilización de carne no convencional para su venta o empleo en la elaboración de productos cárnicos, ya que la identificación

de la especie animal es difícil una vez que la carne ha sido tomada de la canal y que las características anatómicas han sido destruidas⁽¹⁾; por ejemplo, en Gran Bretaña se han mencionado casos de adulteración de carne de bovino con carne de equino, sobre todo en carne deshuesada, congelada y picada, debido a que de esta forma la especie animal no puede ser identificada por examinación visual o por pruebas físico-químicas simples⁽²⁾.

La determinación del origen de la especie animal en carne es una tarea importante en la inspección de alimentos, no sólo en el caso de carne cruda, sino también en el caso de la utilización de carnes de bajo

^a Recibido el 26 de enero de 2000 y aceptado para su publicación el 23 de octubre de 2000.

^b Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua, Admón. de Correos 4-28, 31031 Chihuahua, Chih Tel (14) 34-03-03, Fax (14) 34-03-45, jgarci@uach.mx Correspondencia y solicitud de separatas.

^c Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua.

^d División de Posgrado e Investigación, Facultad de Zootecnia, Universidad Autónoma de Chihuahua.

costo por la industria, para la preparación de productos cárnicos⁽³⁾. Por medio del análisis de alimentos se puede comprobar las sustituciones fraudulentas de carnes de alto valor económico por carnes baratas; la identificación de especies, en conjunto con la cuantificación de los niveles de adulteración, son un pre-requisito en el control de calidad de los alimentos, por lo cual es necesario poder identificar las especies para implementar medidas legislativas⁽⁴⁾. En muchos países, ciertas especies cárnicas están restringidas por leyes nacionales, culturales o religiosas, por lo que son necesarios métodos confiables para la identificación de especie⁽⁵⁾. Por ejemplo, en México las regulaciones en el control sanitario contemplan la verificación de productos y establecimientos, por lo que se hace necesario contar con este tipo de técnicas que puedan ayudar a aplicar las sanciones correspondientes a las carnicerías que no se apeguen a las normas de control sanitario y de calidad establecidas⁽⁶⁾.

Por lo anterior, se consideró importante y necesario el desarrollo y establecimiento de una técnica de rutina para la identificación del origen de la especie animal en carne fresca, así como la determinación de la frecuencia de venta de carne de equino sin autorización, en carnicerías de la ciudad de Chihuahua.

El trabajo se desarrolló conjuntamente con la Facultad de Zootecnia y la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Para la obtención de los antígenos de carne fresca de equino y porcino, el magro de estas dos especies se adquirieron en

carnicerías comerciales, cada una de estas carnes fueron preparadas para la obtención de antígenos de acuerdo a la técnica descrita por Kang'ethe *et al.*⁽⁷⁾. Inmediatamente después se determinó la cantidad de proteína para estimar el volumen de antígeno, equivalente a 5 mg de proteína necesaria en la inoculación de las cabras para la producción del antisuero, empleando un espectrofotómetro a 660 nanómetros de longitud de onda, de acuerdo a la técnica descrita⁽⁸⁾.

En la obtención de los antisueros se utilizaron un total de cuatro caprinos (dos para cada antígeno producido); los animales provenían de un hato de los Laboratorios de Enseñanza e Investigación de la Facultad de Zootecnia, los cuales presentaban una condición corporal buena; la alimentación era en base a pastoreo y suplementación en corral. Para el estudio no se tomó en cuenta la edad, raza, ni sexo.

La inoculación de los animales se realizó una vez a la semana durante un periodo de cinco semanas; la primera inoculación se llevó a cabo aplicando a cada animal una combinación de 5 mg de antígeno específico (equino o porcino) más 0.5 ml de solución salina fisiológica y 1 ml de adyuvante completo de Freund, los cuales fueron suministrados de manera intramuscular; el proceso de inoculación fue el mismo durante las siguientes tres semanas, sólo fue sustituido el adyuvante completo de Freund por adyuvante incompleto; para la última inoculación (quinta semana) sólo se utilizó antígeno específico y solución salina⁽⁹⁾. A partir de la tercer semana de inoculación, los animales fueron sangrados para obtener el suero e ir probando por medio de la técnica

ORIGEN DE ESPECIE ANIMAL EN CARNE FRESCA CON INMUNODIFUSIÓN DOBLE

de inmunodifusión doble, la potencia y especificidad de los antisueros producidos; a la sexta semana se realizó un sangrado final para la evaluación de muestras. La sangre extraída se dejó coagular durante 24 h para luego centrifugarse a 2000 rpm durante 45 min, el suero obtenido fue alicuotado en tubos ependorff en cantidades de 1.5 ml y congelado de -18 a -22°C hasta su utilización.

Carnes de res, de equino y de porcino se molieron por separado para hacer mezclas de carne de res-equino y res-porcino en porcentajes de 100-0, 70-30, 80-20, 90-10, 95-5 y 0-100, respectivamente. Estas mezclas fueron procesadas y analizadas por medio de la técnica de inmunodifusión doble para determinar el porcentaje mínimo detectable en forma fresca, y al mismo tiempo poder evaluar si los antisueros presentaban o no algún tipo de reacción cruzada con carne de estas tres especies.

La técnica de inmunodifusión doble se estableció de acuerdo a lo descrito por Outcherlony y Nilsson⁽¹⁰⁾, para lo cual se prepararon 50 ml de agar-agar al 0.5% en agua desionizada, este agar fue vertido en portaobjetos en cantidades de 3 ml por placa y fueron secados completamente en estufa a 180°C. Al mismo tiempo se prepararon 50 ml de agarosa al 1% en solución buffer de fosfatos salina (PBS), se agregaron 4 ml de esta solución a cada portaobjetos previamente tratado con agar-agar y se dejó gelificar; una vez gelificada la agarosa, se realizaron cinco pozos, distribuidos uno al centro y cuatro rodeando al primero. En el pozo central se colocó el antisuero y en los cuatro pozos restantes la muestra problema, la

muestra de referencia o el antígeno correspondiente; posteriormente se dejaron incubar a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 24 h para luego observar de forma directa la precipitación de bandas. Una vez observada esta precipitación las placas fueron teñidas⁽¹¹⁾.

La carne fue muestreada en 15 carnicerías de la ciudad de Chihuahua, las cuales fueron seleccionadas de las listas que tiene el municipio para este tipo de establecimientos; el tipo de muestreo usado fue un muestreo estratificado por tipo de carnicería, clasificadas en tres estratos: I) cuatro carnicerías selectas, II) cuatro carnicerías comerciales y III) siete carnicerías populares. La compra de carne se realizó durante cinco semanas de lunes a viernes, muestreándose diariamente tres carnicerías, las cuales fueron sorteadas al azar para realizar el primer muestreo, posteriormente se recorrió un día en la siguiente semana hasta completar cinco muestreos para cada carnicería. Se tomaron como muestras dos tipos de producto por carnicería, carne molida (75 muestras) y pulpa de pierna (75 muestras).

Para el procesamiento de las muestras se tomaron 20 g de carne cruda y se molieron en molino casero marca Moulinex, para posteriormente ser homogeneizados en solución salina fisiológica en proporción 1:2 peso/volumen durante 5 min, luego la muestra fue centrifugada a 5000 rpm durante 20 min y el sobrenadante fue separado para ser utilizado como muestra.

En el análisis de resultados se determinó la frecuencia de muestras positivas a carne de equino, la frecuencia de carnicerías positivas a la venta de carne de equino y

la frecuencia de tipo de producto a adulterar.

Para identificar los diferentes antígenos de las especies animales se obtuvieron dos antígenos, uno de equino (AE) con una concentración de proteína de 34.2 mg/ml y otro de porcino (AP) con 20.2 mg/ml de proteína. En lo referente a la producción del antisuero, se obtuvieron 106 ml de suero anti-equino (α -AE) y 107 ml de suero anti-porcino (α -AP); la cantidad de antisuero necesaria para procesar 100

muestras de producto resultó ser 2 ml, por lo que con la cantidad obtenida se podrían procesar 5,300 muestras.

En la prueba de inmunodifusión doble se observó, la ausencia de bandas de precipitación cuando el antisuero α -AE fue probado con antígenos de carne de porcino y con la muestra de referencia de carne de res al 100%, lo que demuestra que no hay reacción cruzada entre especies, ya que sólo reaccionó con su antígeno correspondiente. Esto evita la necesidad de

Figura 1. Formación del complejo antígeno-anticuerpo específico para carne fresca de equino.



C= Antisuero contra equino fresco; 1= Antígeno de equino fresco;
2= Antígeno de equino termoestable; 3= Antígeno de porcino fresco;
4= Antígeno de porcino termoestable

Figura 2. Formación del complejo antígeno-anticuerpo específico para carne fresca de porcino.



C= Antisuero contra porcino fresco; 1= Antígeno de equino fresco;
2= Antígeno de equino termoestable; 3= Antígeno de porcino fresco;
4= Antígeno de porcino termoestable

ORIGEN DE ESPECIE ANIMAL EN CARNE FRESCA CON INMUNODIFUSIÓN DOBLE

utilizar la inmunoabsorción para tener que eliminar esa reacción, lo que facilita aún más la técnica (Figuras 1 y 2).

Estos resultados coinciden con los mencionados por Hayden⁽¹²⁾ quien tampoco encontró reacciones cruzadas entre estas especies; el hecho de que estos antisueros hayan sido producidos en caprinos elimina reacciones cruzadas, lo cual fue observado por otros investigadores⁽⁷⁾ quienes compararon los antisueros producidos en cabras y conejos, no encontrando reacciones cruzadas en los antisueros producidos en los caprinos.

Los antisueros α -AE y α -AP, resultaron ser lo suficientemente potentes para detectar un nivel de contaminación del 5% de carne de equino y carne de porcino, en las mezclas de referencia preparadas con carne de res. El nivel de contaminación

mínimo detectado concuerda con otros escritos^(5,11). De acuerdo a los resultados obtenidos en este y otros estudios, se puede decir que la técnica de inmunodifusión doble puede ser considerada como un método sensible y efectivo para la detección específica de muestras problema.

De acuerdo a los resultados que se muestran en el Cuadro 1, sólo en las carnicerías que se clasificaron como populares, es donde se realiza la práctica de adulteración; esto se puede atribuir a que los consumidores que acuden a ellas, pertenecen a un estrato socio económico bajo, quienes realizan sus compras en donde se les ofrece un precio accesible a su economía; normalmente estas carnicerías ofrecen el kilogramo de carne a un precio intermedio entre el precio real de la carne de bovino y el de la carne de equino.

Cuadro 1. Muestras y carnicerías positivas a carne de equino en los diferentes estratos y tipo de venta

		Carnicerías		
		Selecta	Comercial	Popular
Muestras	No.	40	40	70
	Positivas	0	0	33
	%	0.0	0.0	47.1
Carnicerías	No.	4	4	7
	Positivas	0	0	4
	%	0.0	0.0	57.1

Cuadro 2. Número de muestras positivas a carne de equino por tipo de producto

Producto	Número	Positivas	Porcentaje
Molida	75	17	22.6
Pulpa	75	16	21.3

En lo referente al tipo de producto adulterado (Cuadro 2), los resultados indican que las carnicerías que realizan esta práctica, aprovechan el hecho de que la carne deshuesada e incluso molida o fileteada impide la identificación de la especie animal de la cual proviene. Un punto de referencia por el cual se podría identificar la especie, es el poder observar la conformación y la estructura de la canal; sin embargo, las carnicerías que realizan esta práctica tienen el cuidado de exhibir sólo los cortes de carne, ocultando la canal.

Los resultados obtenidos nos llevan a concluir que la técnica de inmunodifusión doble puede llegar a detectar un 5% de contaminación en mezclas de carne fresca, además de ser una técnica de fácil manejo, ya que no requiere de un equipo especial y no depende de manera importante de las condiciones ambientales. Asimismo, los resultados del muestreo de carne en las diferentes carnicerías indican que la comercialización sin autorización de carne de equino en la ciudad de Chihuahua, está presente en carnicerías populares, y que el índice de adulteración es elevado.

IDENTIFICATION OF THE ORIGIN OF ANIMAL SPECIES IN FRESH MEAT USING DOUBLE IMMUNODIFFUSION

ABSTRACT

García MJA, Erosa VGE, Prieto C, Núñez GFA. *Téc Pecu Méx* 2000;38(3)231-237. The immunodiffusion technique was used to determine the frequency of horsemeat sold without authorization in the meat retails of Chihuahua city. This technique was

achieved by the obtention of fresh antigen and the production of specific antisera for the horsemeat. This antisera was sufficiently specific and powerful enough to detect a minimum of 5% contamination of fresh horsemeat mixed with beef. Samples were taken from 15 meat retails in the city, divided into three strata: I) Four meat retails that sell selected meat (n= 40); II) Four commercial meat retails (n= 40) and III) Seven popular meat retails (n= 70). Samples were processed and analyzed with the double immunodiffusion technique. From a total of the 150 samples, frequency of positive samples was 33, representing 22%; these positive samples were from stratus III and therefore the positive samples represented 47% of the sample in this stratus. Of the 15 meat chops, four were positive (26.6%). According to the results, the double immunodiffusion technique is a good technique for species identification of fresh meat and it is also easy to implement.

KEY WORD: Identification Meat species, Pork, Horse, Beef, Double diffusion.

LITERATURA CITADA

- 1 Martin R, Azcona JI, García T, Hernández PE, Sanz B. Sandwich ELISA for detection of horse meat in raw meat mixtures using antisera to muscle soluble proteins. *Meat Sci* 1988;22:143-153.
- 2 Kang'ethe EK, Jones SJ, Patterson RLS. Identification of species origin of fresh meat using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. *Meat Sci* 1982;7:229-240.
- 3 Hoffman K. Principal problems in the identification of meat species of slaughter animals using electrophoretic methods. In: Patterson RLS editor. *Biochemical identification of meat species. A seminar in CEC Programme of Coordination of Livestock Productivity Management*. Brussels, Belgium. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York. 1985:9-31.
- 4 Kang'ethe EK, Gathuma JM, Lindqvist KJ. Identification of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to thermostable muscle antigens by Outcherlony's double diffusion test. *J Sci Food Agric* 1986;37:157-166.
- 5 Hvass A. Species identification in minced meat products by immunodiffusion. In: Patterson RLS

ORIGEN DE ESPECIE ANIMAL EN CARNE FRESCA CON INMUNODIFUSIÓN DOBLE

- editor. **Biochemical identification of meat species. A seminar in CEC Programme of Coordination of Livestock Productivity Management, Brussels, Belgium. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York. 1985:53-64.**
- 6 **Prieto C. Identificación de la especie animal de origen en carne fresca y procesada. [tesis maestría]. Chihuahua, Chih. Universidad Autónoma de Chihuahua; 1992.**
- 7 **Kang'ethe EK, Lindqvist KJ, Gathuma JM. Immunological reactions of thermostable muscle antigen and their possible use in speciation of cooked and fresh animal meat. In: Patterson RLS editor. Biochemical identification of meat species. A seminar in CEC Program of Coordination of Livestock Productivity Management. Brussels, Belgium. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers. 1985:129-144.**
- 8 **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Fair AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-274.**
- 9 **Johnstone A. Immunochemistry in practice. Boston, Massachusetts, USA: Blackwell Scientific Publications. 1982.**
- 10 **Outcherlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Handbook of experimental immunology. Weir DM Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1978:120-133.**
- 11 **Wintero AK, Thomsen PD. A comparison of DNA-hybridation, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detection the admixture of pork to beef. Meat Sci 1990;27:75-85.**
- 12 **Hayden AR. Use of antisera to heat-stable antigens of adrenals for species identification in thoroughly cooked beef sausages. J Food Sci 1981;46:1810-1813.**

José Arturo García Macías, *et al.*