

01621
57



**EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA
CAPACIDAD DE IDENTIFICACION DE LA
ESPECIE ANIMAL (AVE, BOVINO Y PORCINO)
A TRAVES DE LA PRUEBA DE
INMUNODIFUSION EN GEL.**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

por

Karla Yuliett Méndez González

Asesor(es):

MVZ. MCV Jorge Francisco Monroy López
MVZ. MSP. Marco Antonio Casillas Fabila



México, D.F., 2003

a



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION DISCONTINUA



**EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CAPACIDAD DE
IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE ANIMAL (AVE, BOVINO Y
PORCINO) A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN EN
GEL**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

de la

**Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista**

por

Karla Yuliett Méndez González

Asesor(es) :

MVZ. MCV. Jorge Francisco Monroy López

MVZ. MSP. Marco Antonio Casillas Fabila

México. D.F., 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DEDICATORIA

A mis padres, familiares y amigos,
por su confianza, cariño y apoyo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en proyectos de investigación (PROBETEL) por el apoyo económico para la elaboración de la presente tesis.

Al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Departamento de Productos Químicos, Farmacéuticos Alimenticios, en particular al Biol. Ernesto G. Ontiveros Fernández Jefe del Departamento de Químicos Farmacéuticos y Alimenticios por el apoyo y tiempo.

Al jurado: MVZ. Jorge López Morales, MVZ. Miguel Ángel Quiroz Martínez, MVZ. José Ángel Gutiérrez Pabello, MVZ Odette Urquiza Bravo y MVZ. Jorge Francisco Monroy López por su tiempo.

A los asesores MVZ. Jorge Francisco Monroy López y MVZ. Marco Antonio Casillas Fabila por su apoyo y tiempo para el desarrollo de la presente tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	2
1.1 GENERALIDADES DE LA TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO OUCHTERLONY)	3
1.1.1 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA REACCIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO OUCHTERLONY)	4
1.1.2 TIPOS DE PATRONES PRODUCIDOS EN LA INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY)	5
1.2 JUSTIFICACIÓN	6
2 HIPÓTESIS	8
3 OBJETIVOS	9
4 MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	10
4.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CÁRNICAS	10
4.3 PREPARACIÓN DE LAS CAJAS DE PETRI	11
4.4 ADSORCIÓN DE LOS ANTISUEROS	12
4.5 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS ANTÍGENOS CONTROLES POSITIVOS	14
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	15
5 RESULTADOS	16
5.1 CARNE DE AVE	16
5.2 CARNE DE BOVINO	16
5.3 CARNE DE PORCINO	16
6 DISCUSIÓN	18
7 LITERATURA CITADA	25
8 FIGURAS. PATRONES PRODUCIDOS EN LA INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY)	31
Fig. 1. Reacción de identidad	31
Fig. 2. Reacción de no identidad	31
Fig. 3. Reacción de identidad parcial	31
Fig. 4. Procedimiento del llenado de los pozos	31
Fig. 5: A-N. Resultados obtenidos de la carne de ave por medio de la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony).....	32
Fig. 6: A-N. Resultados obtenidos de la carne de bovino por medio de la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony).....	34
Fig. 7: A-N. Resultados obtenidos de la carne de porcino por medio de la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony).....	36
Fig. 8-21. Gráficas	38

9 CUADROS	41
Cuadro 1. Frecuencia de los resultados negativos a la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony)	41
Cuadro 2. Coeficientes de correlación de las diferentes temperaturas de incubación	41

v

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

MÉNDEZ GONZÁLEZ, KARLA YULIETT. Efecto de la temperatura sobre la capacidad de identificación de especie animal (ave, bovino y porcino) a través de la prueba de inmunodifusión en gel (bajo la dirección de: MVZ. MCV. Jorge Francisco Monroy López y MVZ. MSP. Marco Antonio Casillas Fabila).

Se analizaron muestras de carne de ave, bovino y porcino con el propósito de determinar la temperatura y tiempo de incubación en la que se pierde la capacidad de identificar las proteínas de la carne en la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony). De las 120 muestras analizadas de cada especie animal se encontró que las líneas de precipitación no son visibles en la carne de ave a temperaturas de: 60° C durante 40', 65° C durante 30' y 40', 70° C durante 20', 30' y 40' y > de 75° C durante 20'; en la carne de bovino a > 70° C durante 40' y la carne de porcino a > 70° C. Se determinó que los coeficientes de correlación (r_s) en las especies cárnicas rebasan el valor crítico correspondiente al nivel de significancia de 0.05 (0.829), es decir, que los resultados tiene un 95% de confiabilidad. Se concluye que la prueba es útil para carne cruda que no haya sufrido un tratamiento térmico mayor a 60° C, pero no necesariamente es aplicable a carnes que hayan sufrido un proceso térmico, lo cual debería ser considerado en la Norma Oficial Mexicana de Identificación de Especie Animal.

1 INTRODUCCIÓN

La carne se define como la estructura compuesta por fibras musculares estriadas, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos, de las especies autorizadas para el consumo humano.¹ La unidad esencial del tejido muscular es la fibra, que consta de miofibrillas, elementos de naturaleza proteica cuyas principales proteínas son la actina y la miosina.^{2,3,4} Los principales aminoácidos presentes en el músculo fresco son alfa alanina, glicina, ácido glutámico e histidina.³ En general, las carnes contienen aproximadamente 75% de agua, 18% de proteína, 3.5% de sustancias no proteínicas solubles y 3% de grasa.^{3,4}

La carne está sujeta a sufrir alteraciones reduciendo su aporte nutricional, así como también adulteraciones sobre todo en carnes picadas y embutidos con el fin de abaratar o falsificar una preparación,^{5,6,7} ocasionando un problema, no sólo ético sino también económico y en algunos casos sanitario.^{8,9} Durante su producción, preparación, distribución, almacenamiento y consumo debe asegurar inocuidad,¹⁰ de lo contrario; constituye un riesgo biológico para la salud pública mediante la contaminación microbiana.² Se ha visto que las carnes picadas sirven como vehículo de enfermedades como: salmonelosis (*Salmonella* spp.) y brotes de colitis hemorrágica por *Escherichia coli*. O157:H7.¹¹

El Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés) ha estimado que los patógenos entéricos asociados con productos comestibles de origen animal, causan de

6.5 a 81 millones de casos de enfermedades cada año en el territorio Norteamericano.¹²

Dentro de las principales adulteraciones que se presentan en la carne está la sustitución de especies animales como: caballo por bovino,⁵ conejo por pollo, gato por conejo y cabra por cordero, además de la adición de carne u órganos de animales de caza y carne de perro.^{13,14}

La identificación de especies cárnicas es una tarea importante en la inspección del alimento de origen animal,¹⁵ cuando el consumidor compra este producto cárnico en lugares dudosos puede ser fácilmente confundido o engañado ya que al adquirirlo no siempre realiza pruebas sensoriales como: olor, sabor, color y textura; además de que éste método no es muy confiable para la determinación del origen cárnico.⁸

La prueba de precipitación en gel, desde 1901, ha demostrado su utilidad para determinar el origen de especies cárnicas, ésta se basa en la presencia de proteínas en el músculo y en la sangre.^{6,14,17}

1.1 GENERALIDADES DE LA TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY)

La prueba de Inmunodifusión doble en gel por el método de Ouchterlony permite identificar fácilmente sistemas de antígeno-anticuerpo múltiples difundiendo de forma radial en el agar noble.^{18,19} Cuando se encuentran en proporciones óptimas aparece una línea de precipitación visible. Este método se puede utilizar para

¹ DIFCO, Labs. Detroit, Mich., USA.

hacer estimaciones semi-cuantitativas y cualitativas de la pureza del antígeno o anticuerpo.^{13, 20, 21, 22, 23, 24, 25}

1.1.1 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA REACCIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY)

Las condiciones óptimas que favorecen la velocidad de difusión para un antígeno, o para una población de anticuerpos, dependerá de:

- La concentración de moléculas: por ejemplo cuando las concentraciones de los reactantes son equivalentes y sus pesos moleculares son similares, las bandas de precipitación tienen forma recta y se encuentran equidistantes de los pozos. Si no hay equivalencia en la concentración, el sistema o los sistemas precipitantes se forman más cerca del pozo con aquel reactante cuya concentración sea menor, es decir, la velocidad de difusión es proporcional a la concentración.²⁴
- La temperatura: a temperatura elevada acelera la difusión y a temperatura baja la precipitación es lenta.²⁴
- El tamaño de las moléculas: las moléculas más pequeñas difunden más rápido que las grandes, es decir, la velocidad de difusión es inversamente proporcional al peso molecular.²⁴
- La forma de las moléculas: las moléculas redondas se mueven más rápido.²⁴
- La humedad: permite hidratar el medio evitando que se fraccione el agar.²⁶
- El tiempo de incubación: permite que se formen las líneas de precipitación (24- 48hr).²⁶

La presencia de más de una banda de precipitación en la prueba de Inmunodifusión doble en gel, significa la existencia de varios sistemas antígeno-anticuerpo, es decir, que una banda representa un sólo sistema. De este modo, el número de bandas de precipitación representa el número en la prueba.²⁴

1.1.2 TIPOS DE PATRONES PRODUCIDOS EN LA INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY)

- **Identidad:** ocurre cuando dos antígenos comparten epitopos idénticos. Como el antisuero forma una sola línea de precipitina con cada antígeno (Ag), la segunda línea crece hacia cada uno y se une dando una línea curva única de identidad (Fig.1).^{18,21,24}
- **No identidad:** ocurre cuando en dos antígenos no hay relación, es decir, no comparten un epitopo común. El antisuero forma una línea de precipitina independiente con cada antígeno y las dos líneas se cruzan (Fig. 2).^{18,21,24}
- **Identidad parcial:** ocurre cuando las líneas se fusionan y forman una espuela existe una identidad parcial, lo que indica que un antígeno tiene epitopos que no existen en el otro (Fig. 3).^{18,21,24}

Este método permite la identificación de especie de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, cabras,^{13,16} y aves²⁷ se aplica en muestras de carne fresca, congelada o seca;^{13,16} sin embargo, cuando la carne es sometida a una temperatura de 60 a 70° C se produce un cambio químico que ocasiona la desnaturalización de las proteínas.^{3,28,29,30}

Los cambios que sufre la carne con el incremento de la temperatura son variables, por ejemplo: a temperaturas mayores de 50° C hay compresión de las miofibrillas, a 60° C se presenta coagulación de los filamentos delgados y gruesos, lo cual provoca encogimiento de las miofibrillas y granulación del sarcolema, a los 70° C se presenta fragmentación miofibrilar del disco Z, a los 80° C desintegración de los filamentos delgados y gelatinización de las fibras de colágeno y a los 90° C las estructuras empiezan a ser amorfas.²⁸

1.2 JUSTIFICACIÓN

Para la realización de este estudio se eligió la prueba de Inmunodifusión doble en gel por el método de Ouchterlony, debido a que la Norma Oficial Mexicana (NOM-023-ZOO-1995)²⁷ para la identificación de especie animal en músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, establece el uso de la prueba de Inmunodifusión en gel, por ser la que proporciona la mayor confianza al comercio internacional de alimentos tanto en lo importado como en lo exportado, con el fin de asegurar que el consumidor adquiera el alimento correspondiente; sin embargo, no se señala la viabilidad de la prueba con productos que han sido sometidos a temperaturas mayores a 60° C.

Dado que la NOM-023-ZOO-1995²⁷ no especifica si la prueba anteriormente mencionada es aplicable a carnes crudas, precocidas, cocidas, curadas y secas, y tampoco señala sus posibles desventajas al utilizarla, se consideró importante el poder indicar a qué temperatura y tiempo de incubación las líneas de

precipitación no se presentan en las especies animales (ave, bovino y porcino).

2 HIPÓTESIS

A temperaturas mayores de 60° C la prueba de Inmunodifusión doble en gel pierde la capacidad de identificar a las proteínas de ave, bovino y porcino en carnes.

3 OBJETIVOS

A) Determinar a qué temperatura y tiempo de incubación se pierde la capacidad de identificar proteínas de ave, bovino y cerdo en carne a través de la prueba de Inmunodifusión doble en gel, por el método de Ouchterlony.

B) Identificar las diferencias de temperaturas y tiempos de incubación para cada especie animal (ave, bovino y porcino) en que la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony), pierde la capacidad de identificar las proteínas de la carne.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Agar noble¹ al 2%: se pesaron 2 g de agar noble y se disolvió en 100 ml de agua destilada por calentamiento y agitación.³¹

Solución salina al 0.85% (SSF): en 1000 ml de agua destilada se disolvió 8.5 g de Cloruro de sodio.¹¹³¹

4.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS CÁRNICAS

Se adquirieron 10 kg de pechuga de pollo, 10 kg de aguayón deshuesado y 10 kg de pierna de cerdo en carnicerías con productos cárnicos provenientes de un rastro Tipo Inspección Federal (TIF), con el propósito de obtener muestras frescas y fueron transportadas en cajas isotérmicas de 0°C a 4°C, al laboratorio del Centro Nacional de Servicios de Constatación de Salud Animal del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria de la Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Departamento de Químicos Farmacéuticos y Alimenticios (Carr. Cuernavaca-Cuatla Km. 11.5 Jiutepec, Morelos), en donde se realizó la prueba de Inmunodifusión doble en gel por el método de Ouchterlony, de acuerdo a la NOM-023-ZOO-1995,^{27,31} con las siguientes modificaciones:

Para cada especie animal se tomaron 10 kg de muestra de carne, misma que fue perfectamente picada con un cuchillo estéril para evitar contaminar los tejidos con los fluidos de otras muestras. De la carne picada se tomaron porciones de 100 g excluyendo el

¹ DIFCO, Labs. Detroit, Mich., USA.

¹¹ Mallinckrodt Specialty, Chemicals, USA.

tejido graso, posteriormente fueron sometidas a temperaturas de 55° C, 60° C, 65° C, 70° C, 75° C y 80° C, en cada caso durante periodos de 10, 20, 30 y 40 minutos, adicionándoles 100 ml de agua destilada, con el propósito de que las temperaturas fueran constantes se mantuvieron en un horno de esterilización¹¹ de la marca Felisa.

Una vez sometidas al proceso térmico, en tubos de centrifugación de 50 ml se pesaron 10 g (obteniendo 24 muestras de cada especie animal con sus 5 repeticiones dando un total de 120 muestras para cada especie cárnica) y se les adicionó 30 ml de solución salina al 0.85%, para posteriormente colocarlas en un agitador mecánico modelo M50825⁵ durante 90 minutos, luego las muestras fueron centrifugadas a 7000 g durante 10 minutos en una centrifugadora modelo EXEVD⁶ y la fracción soluble del extracto salino fue separada para ser utilizada inmediatamente.^{15,27,31}

4.3 PREPARACIÓN DE LAS CAJAS DE PETRI

Para la preparación de las placas se utilizaron cajas de Petri de 100x15mm desechables estériles, las cuales se colocaron sobre una superficie perfectamente plana y nivelada. A cada caja de Petri se le agregó lenta y cuidadosamente 15 ml de agar noble fundido al 2%, evitando la formación de burbujas, permitiéndosele solidificar durante 30 minutos a temperatura ambiente. El grosor de la capa de agar fue de 3mm con uniformidad en toda la superficie de la caja de Petri. En una tarjeta se diseñó un modelo o guía, para ubicar

¹¹ Felisa, Guadalaajara, Jalisco.

⁵ Thermolyne Moto Mix, Barnstead, serie 1088991194949, USA.

⁶ Internacional Equipment Company, serie 81961317, USA.

las perforaciones, la distancia entre cada perforación fue de 5 mm. Posteriormente se colocaron las cajas de Petri sobre la guía y con una puntilla de color azul de 1000 microlitros, la cual fue recortada del extremo inferior, se utilizó como sacabocado, ésta fue colocada sobre la superficie del agar y fue presionada con firmeza, el agar residual fue retirado con una aguja de disección.^{21,22,31}

4.4 ADSORCIÓN DE LOS ANTISUEROS

Los Antisueros comerciales^{*} que se utilizaron fueron: Anti-pollo, Anti-bovino y Anti-porcino los cuales presentan un certificado de análisis que garantiza la calidad de estos productos.

Características del Antisero de pollo:^o

Identidad: Inmunolectroforesis (IEP) forma múltiples líneas de precipitación contra el suero normal de ave y líneas únicas de precipitación contra IgG anti-conejo.

Proteína por biuret: 64mg/ml

Características del Antisero de Bovino:^o

Especificidad: el antisero es determinado por Inmunolectroforesis (IEP).

Identidad: la electroforesis del antisero es seguido por la difusión contra antisero de conejo resultando múltiples líneas de precipitación contra IgG anticonejo y líneas únicas de precipitación observadas en la región gamma.

Concentración del contenido de proteínas: no más de 90 mg/ml en biuret.

^{*} Sigma, Chemicals, USA.

Características del Antisuero de porcino:^{*}

Contenido de proteínas por biuret: 60 mg /ml

Especificidad por Inmunolectroforesis: múltiples líneas de precipitación contra suero normal de porcino.

Identidad por Inmunolectroforesis: líneas únicas de precipitación contra IgG anticonejo y múltiples líneas de precipitación contra suero completo de anticonejo.

La adsorción de los antisueros comerciales^{**} se realizó con el fin de evitar reacciones cruzadas indeseables y para obtener más cantidad de los antisueros de la siguiente manera:^{††}

Por cada 2 mililitros de antisuero de bovino[°] se adicionaron 600 microlitros de antígeno control positivo de porcino y 600 microlitros de antígeno control positivo de equino, se dejaron incubar en un agitador mecánico modelo M50825[°] durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugaron a 7000 g durante 10 minutos en una microcentrifugadora modelo micro-A 912NC190,[‡] envasados en alícuotas de trabajo y congelados a -70°C.^{††}

En el caso del Antisuero de porcino[°] se siguió el mismo esquema, pero se empleó antígeno de bovino y equino como control positivo a adicionar.

El Antisuero de ave no se adsorbió porque no presenta reacciones cruzadas con los antígenos de las muestras de bovino y porcino.

^{*} Sigma, Chemicals, USA.

[†] Thermolyne Moto Mix, Barnstead, serie 1088991194949, USA.

[‡] Maratón Micro A Fisher Scientific, serie 912NC190, USA.

4.5 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE LOS ANTÍGENOS CONTROLES POSITIVOS

De las diferentes especies cárnicas se pesaron 10 g del músculo de cada especie animal y se colocaron en tubos de centrifugación de 50 ml a los que se les adicionaron 30 ml de SSF, para posteriormente ser colocadas en un agitador mecánico modelo M50825^f durante 90 minutos y centrifugadas a 7000 g durante 10 minutos en una centrifugadora modelo DINAC^{1115.31} y después con una micropipeta se tomaron 30 microlitros para llenar parcialmente los 5 pozos de la periferia con el extracto del tejido que recibió el tratamiento que anteriormente se mencionó, hasta formar un menisco cóncavo. En uno de los pozos de la periferia se colocaron 30 microlitros del antígeno control positivo y en el pozo del centro 30 microlitros del Antisuero adsorbido (Fig. 4).³¹

Posteriormente se colocaron las cajas de Petri en una cámara húmeda, la cual fue elaborada saturando toallas de papel con agua adicionándole aproximadamente 125 ml en una hielera de plástico modelo 1805 0835-2^v de cierre hermético, ahí se colocaron por 24 horas en incubación a temperatura ambiente.^{27.31}

Después se les agregó benzal al 50% con el fin de almacenarlas durante un corto tiempo y hacer más visibles las líneas de precipitación, la lectura de las placas fue por medio de un contador de colonias modelo 3327.^c

^f Thermolyne Moto Mix, Barnstead, serie 1088991194949, USA.

¹¹ Clay Adams serie 121004, USA.

^v Rubbermaid, México.

^c Darkfield Québec Colony Counter, USA.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron evaluados por el coeficiente de correlación simple (Spearman),³² para comparar a qué temperatura y tiempo de incubación la prueba de Inmunodifusión doble en gel pierde la sensibilidad de identificar a las proteínas de ave, bovino y cerdo.

Tipos de variables con las que se trabajó:

- ◆ Variable independiente cuantitativa: temperatura y tiempo.
- ◆ Variable dependiente cuantitativa discreta: frecuencia de la presentación de líneas de precipitación formadas por la reacción antígeno-anticuerpo.

Cada tratamiento se realizó con 5 repeticiones, con el objeto de tener una confianza mayor o igual al 95%.

5 RESULTADOS

5.1 CARNE DE AVE

Los resultados de las 120 muestras de ave analizadas por la técnica de Inmunodifusión doble en gel, se muestran en la figura 5: E, G, H, y L, en las que se observa que las líneas de precipitación son visibles a temperaturas de 75° C y 70° C durante 10 minutos, 65° C durante 10 y 20 minutos y menores de 60° C durante 30 minutos; sin embargo, a temperaturas de 60° C durante 40 minutos (Fig. 5: F), 65° C durante 30 y 40 minutos (Fig. 5: G), 70° C durante 20, 30 y 40 minutos (Fig. 5: I-K) y temperaturas mayores de 75° C durante 20 minutos (Fig. 5: M y N) las líneas de precipitación no son observables (Fig. 5) (Cuadro 1).

5.2 CARNE BOVINO

De las 120 muestras de bovino analizadas por la técnica de Inmunodifusión doble en gel los resultados fueron: que a temperaturas menores de 70° C durante 30 minutos (Fig. 6: A-K) las líneas de precipitación son visibles; sin embargo, a temperaturas mayores de 70° C durante 40 minutos (Fig. 6: L-N) las bandas de precipitación no se observan (Cuadro 1).

5.3 CARNE DE PORCINO

De las 120 muestras de porcino analizadas por la prueba de Inmunodifusión doble en gel por el método de Ouchterlony los resultados fueron: a temperaturas menores de 65° C durante 40 minutos (Fig. 7: A-H) las líneas de precipitación son visibles; sin embargo, a temperaturas mayores de 70° C durante 10 minutos (Fig. 7: I-N) las bandas no son observables (Cuadro 1).

De acuerdo al análisis estadístico, se determinó que los coeficientes de correlación (r_s) (Cuadro 2) en las especies animales cárnicas rebasan el valor crítico correspondiente al nivel de significancia de 0.05 (0.829), es decir, que existe una asociación de tipo positivo entre las temperaturas y tiempos de incubación con la frecuencia de las líneas de precipitación, indicando que cuando se aumenta la temperatura y tiempo de incubación aumenta la presencia donde la prueba de Inmunodifusión doble en gel pierde la capacidad de formar líneas de precipitación (Fig. 8-21).

6 DISCUSIÓN

Con respecto a los resultados obtenidos en este estudio, se encontró que la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony), en el caso de la especie de ave, las líneas de precipitación no son visibles a temperaturas de 60° C durante 40 minutos (Fig. 12), 65° C durante 30 y 40 minutos (Fig. 13), 70° C durante 20, 30 y 40 minutos (Fig. 14) y temperaturas mayores de 75° C durante 20 minutos (Fig. 15 y 16), debido a que existe un comportamiento de desnaturalización compleja durante el calentamiento.³³ La miosina de la pechuga de pollo contiene al menos 10 dominios, cada uno de los cuales presenta una estabilidad térmica distinta. Los dominios son unidades cooperativas independientes que se observan dentro de las moléculas de proteína plegadas. Las regiones de las moléculas de miosina se despliegan por el calentamiento de la siguiente manera: en la región de mermiosina ligera (LMM) se despliega a los 39° C, el dominio de subfragmento-2 a los 46° C, el subfragmento 1 y la cadena ligera alcalina (LC) se despliega a los 48° C.³³ A temperaturas superiores a 75° C, los dominios de la miosina se encuentran desplegados. En el caso de los filamentos de actina (actina F) del músculo de pechuga de pollo, poseen una única transición a los 75.5° C y cuando se calienta la actina F, se coagula formando agregados.³³ La carne de bovino a temperaturas mayores de 70° C durante 40 minutos, en la técnica de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony), las líneas de precipitación no son visibles debido que la reacción inmunológica (antígeno-anticuerpo) no se presenta

(Fig. 18 y 19), porque a temperaturas de 70° C, se produce una desnaturalización de las proteínas,³ por lo tanto, la carne cuando se encuentra a temperaturas de 63° C se puede considerar casi cruda y jugosa, en su interior con color rojo brillante y la superficie está cubierta de una capa café delgada que contiene hemicromo de globina desnaturalizada; a los 71° C, en comparación a lo anterior es menos jugosa y adquiere un color más rosa debido a que se ha desnaturalizado una mayor parte de la mioglobina y a los 77° C, es menos jugosa con un color café uniforme y se considera una carne bien cocida.^{3,4}

En la carne de porcino se observó que a temperaturas menores de 70° C las líneas son visibles (Fig. 20); sin embargo, mayores de 70° C durante 10 minutos las líneas de precipitación no son visibles (Fig. 21), muy posiblemente a que las proteínas se han desnaturalizado porque la carne tiene una consistencia bastante blanda y es de fibras finas; sin embargo, cuando la carne es cocinada adquiere un color gris claro, así como también tiene más cantidad de grasa externa y entreverada, a diferencia de todos los demás tipos de carnes.^{4,34}

En la presente investigación se demostró que los resultados obtenidos por la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony) tienen un 95% de confiabilidad, debido a que las diferentes temperaturas y tiempos de incubación desempeñan un papel importante en la reacciones inmunológicas de las diferentes especies animales (ave, bovino y porcino). De acuerdo con los resultados obtenidos, se identificó que la carne de bovino tiene

una mayor resistencia al tiempo de incubación con relación a su temperatura, en cambio la de ave es más sensible al tiempo de incubación con relación a las diferentes temperaturas a que fueron sometidas, así como también la de cerdo resultó más sensible a las diferentes temperaturas y tiempos de incubación (Fig. 8-21).

De acuerdo con las investigaciones que se han realizado sobre la prueba de Inmunodifusión doble en gel por el método de Ouchterlony, se encontró que Domínguez,²⁸ tomó el extracto de carne de carnero, cerdo, cabra, perro y caballo, las sometió a temperaturas de 56° C, 66° C y 76° C y carne cocida durante 30 minutos. Los resultados fueron que a temperaturas de 76° C durante 30 minutos las líneas de precipitación no se observan los cuales fueron probadas por el método del anillo de Ascoli, obteniendo resultados negativos; sin embargo, en éste estudio no trabajaron con carne de ave ni de bovino, los resultados no son concisos ni explican el seguimiento de las temperaturas y tiempos de incubación.

En otro estudio que se llevó a cabo por Romano y Rubio,³⁰ sometieron los extractos de la especies animales de equino, bovino y porcino a temperaturas de 50° C durante 30', 60° C durante 30', 60° C durante 60', 70° C durante 30', 70° C durante 60', 70° C durante 75' 70° C durante 90' y 80° C durante 30' y encontraron que la especie equina tiene mayor resistencia a la temperatura que la de cerdo o bovino, ya que la reacción en la especie equina dio positiva hasta 70° C durante 60 minutos, la porcina a 70° C durante 30 minutos y la bovina a temperaturas de 60° C durante 60

minutos, en ésta investigación los extractos obtenidos de las carnes las sometieron a las temperaturas que anteriormente se mencionan; sin embargo, el seguimiento de las temperaturas y tiempos de incubación, no son explicadas en este estudio.

Cabe señalar que, mientras que en las dos investigaciones mencionadas no utilizaron carne de ave y el seguimiento de sus estudios fueron con los extractos obtenidos de la carne de cada especie sometiéndolas a diferentes calentamientos, así como también las temperaturas y tiempos de incubación no llevan un seguimiento lógico.^{26,30}

En los dos trabajos la obtención de los antisueros lo realizaron inmunizando conejos.^{26,30}

Es evidente que las especificaciones sobre la viabilidad de la prueba de Inmunodifusión doble en gel cuando las especies cárnicas han sido sometidas a algún tratamiento térmico, deben ser consideradas en la Norma Oficial Mexicana de Identificación de Especie Animal,²⁷ ya que es importante el destacar que la técnica es viable cuando la carne está cruda y que no haya sufrido ningún tratamiento térmico mayor de 60° C, porque, a partir de esta temperatura, se empieza a presentar un cambio en el tejido muscular, ocasionando la pérdida de la especificidad y la antigenicidad de la técnica.

La prueba de Inmunodifusión doble en gel por el método de Ouchterlony funciona en base a la temperatura y tiempo de incubación; esto se demuestra porque la hipótesis propuesta en el presente trabajo se cumplió, es decir, a temperaturas mayores de

60° C pierde la capacidad de identificar las proteínas de ave, bovino y porcino en carnes e inclusive existen diferencias de temperaturas y tiempos de incubación para cada especie animal. La prueba de Inmunodifusión doble en gel debe aplicarse exclusivamente a carne cruda que no haya sufrido un tratamiento térmico superior a 60° C; sin embargo, para la identificación de especies en productos cárnicos que hayan sido sometidos a un tratamiento térmico superior, debería utilizarse un proceso de diálisis que permita la concentración de las proteínas.^{13,31} Por otro lado, los Antiseros que se utilizan para la realización de la prueba, deben tener un certificado de calidad para que los resultados obtenidos sean más confiables, es decir, que cuando se adquieren Antiseros de instituciones que no proporcionen ningún certificado, los resultados podrían caer en la incertidumbre. De acuerdo con las consideraciones anteriormente mencionadas sobre el uso de la técnica, es importante señalar que, si no se lleva a cabo un seguimiento correcto para su desarrollo, es probable obtener resultados falsos positivos. Las diferencias entre las temperaturas a las cuales la prueba deja de funcionar, entre las distintas especies animales, permite suponer que hay diferentes condiciones de transmisión de la temperatura hacia el interior de la carne, tales microorganismos como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*,³⁵ agentes productores de enfermedades transmitidas por alimentos, puedan provocar implicaciones importantes en salud pública.

Por ejemplo, se menciona que *Escherichia coli* 0157:H7: causa colitis hemorrágica por consumo de carne de res molida y como medida preventiva se recomienda cocinar la carne a 75° C durante 3 minutos porque a esta temperatura la bacteria se destruye.³⁶ Con respecto a la *Salmonella* spp., su vía de transmisión es digestiva y las temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre 35 y 37° C y como la mayoría de las bacterias Gram negativas, presentan una cierta sensibilidad al calor. La destrucción de salmonelas (10⁷ UFC) en asado de carne de res requiere tratamientos de 72° C durante 5 minutos; 68° C durante 12 minutos; 57.2° C/37 minutos; 54.4° C durante 121 minutos.^{37,38,39} Por otro lado, *Staphylococcus aureus* se destruye lentamente a 60° C por medio de la pasteurización,³⁹ las de *Clostridium botulinum* se destruyen lentamente a 100° C durante 10 minutos.^{39,40} Se sabe también que la muerte de triquinela es a 57.8° C durante 3 minutos^{37,41} y los cisticercos se destruyen a 57° C.⁴² En todos estos casos habría que comprobar cuál es el comportamiento de termodestrucción en carne de cada especie.

El Food Safety and Inspection Service (FSIS) especifica las siguientes temperaturas internas de la carne que son necesarias para lograr los niveles específicos de cocimiento: para la carne molida y mezclas como: pavo con pollo 74° C; para carne de res con ternera, cordero, y cerdo 71° C; para hamburguesas 71° C; para carne de res, ternera, cordero fresco: medio crudo 63° C, punto medio 71° C y bien cocido 77° C; para carne de cerdo fresco: punto medio 71° C y bien cocido 77° C; para jamón fresco (crudo) 71° C y

precocinado (para recalentar) 60° C; para asado de res cocinado comercialmente, envasado al vacío y listo para comer 60° C; para carne de pollo y pavo entero 82° C; para pechuga de pollo 77° C y para carne de pato y ganso 82° C.^{42,43} Como se puede observar, sí existen diferencias bioquímicas dependiendo de la especie animal de la que proceda la carne.

Es importante señalar que la prueba de Inmunodifusión doble en gel por el método Ouchterlony para la identificación de especie animal tiene como ventaja el ser segura y más económica en comparación de otras pruebas como: Prueba de Inmunosorbente Ligada a Enzimas (ELISA) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR),^{15,43,44} sin embargo, sus desventajas son su baja sensibilidad^{43,24} y la posibilidad de resultados inespecíficos debido a que alrededor de los lugares de carga electrostáticas, se forman precipitaciones circulares "areolas" sobre todo cuando se emplean sueros intensamente lipémicos o envejecidos.²⁶

No obstante lo anterior, el método es útil para identificar las líneas de precipitación de las diferentes especies animales en un tiempo aceptable y con inversión de modestos recursos.^{16,44,45}

7 LITERATURA CITADA

1. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-009-ZOO-1994. Proceso sanitario de la carne. Diario Oficial de la Federación 1994 noviembre 16.
2. Vorano A. Calidad de la carne vacuna. Agrovisión [serial online] 1999 Nov-Dic [cited 2001 Oct 27]; 37: [46 screens]. Available from URL:<http://www.agrovision.com.ar/37/46.htm>
3. Lawrie RA. Ciencia de la carne. España: Acribia, 1974.
4. Charley H. Tecnología de alimentos. Procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. México: Limusa Noriega Editores, 1997.
5. Brandly PJ, Migaki C. Meat hygiene. 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1966.
6. Leyes y Códigos de México. Ley General de Salud. En: Ley de Salud para el Distrito Federal y Disposiciones Complementarias, Porrúa, editores. Control sanitario de productos y servicios y de su importación y exportación. México, D.F.: Porrúa Editores, 1998: 35-38.
7. Blood DC, Studdert VP. Diccionario de Veterinaria. 1ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 1993.
8. Cordal ME, Petracca A, Moro AA. Preparación de reactivos para la detección de proteínas de diferente especies animales por inmudifusión. Rev Argen de Microbiol 1985; 17:209-216.
9. Verbeke W, Warnants N, Viaene J, Boucqué CV. Consumer perception facts and possibilites to improve acceptability of health and sensory characteristics of pork. Meat Sci 1999; 53:77-99.

10. Untermann F. Higiene en la obtención y procesamiento de la carne. *Fleishwirtsch* 1990; 1:3-7.
11. Moreno GB, Maluenda DP. El sistema de riesgo y puntos críticos. España: Acribia, 1991.
12. Smith DM. Immunoassays in process control and speciation of meats. *Food Technol* 1995; 49:116-119.
13. Almaraz MG. Identificación de especie animal como adulterante en chorizo, longaniza y carne molida cruda para hamburguesa (tesis de licenciatura). México (DF). México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 1993.
14. Septién BG. Contribución al estudio de las adulteraciones más frecuentes en las salchichas que se elaboran y consumen en el Distrito Federal (tesis de licenciatura). México (DF). México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM, 1962.
15. García MJA, Erosa VGE, Prieto C, Núñez GFA. Identificación del origen de especie animal en carne fresca utilizando inmunodifusión doble. *Tec Pec Mex* 2000; 38:231-237.
16. Becquer LA, García GM, Valladares C, Ríos M, Beltrán LG. Identificación serológica de especies animales usadas como ingredientes de productos cárnicos. *Rev Cub Alim Nut* 1999; 13:14-17.
17. Kamiyama T, Katsube Y, Imaizumi K. Serological identification of animal species of meat by a passive hemagglutination inhibition test using cross-reacting anti-serum albumin antiserum. *Jap J Vet Sci* 1978; 40:653-661.

18. Goldsby AR, Osborne AB. Kubby Immunology. 4th ed. New York: Freeman and company, 2000.
19. Barret TJ. Inmunología, inmunoquímica e inmunobiología. 4th ed. México: Interamericana, 1985.
20. Francois BJ. Inmunología. México: Limusa, 1984.
21. Tizard IR. Inmunología veterinaria. 5a ed. México: McGraw-Hill, 1998.
22. Magaeu RP. Animal species determination, immunological. USDA/FSIS Microbiology laboratory guidebook 3rd ed. [seial online] 1998 [cited 2002 Enero 13]; [23 screens]. Aavailable from URL:<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgch21.pdf>
23. Weir MD, Stewart J. Inmunología. México: El manual moderno, 1995.
24. Morilla GA, Bautista RC. Manual de inmunología. México: Diana, 1986. 52-55.
25. Hefle SL. Immunoassay fundamentals. Food Tech 1995; 49:102-107.
26. Domínguez IM. Identificación de las especies animales de que proviene la carne para consume humano por el método de inmunodifusión. (tesis de licenciatura). México (DF). México: Facultad de Química UNAM, 1971.
27. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-023-ZOO-1995. Identificación de especie animal en músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, por la prueba de inmunodifusión en gel. Diario Oficial de la Federación 1995 septiembre 14.

28. Palka K, Daun H. Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine *M. semitendinosus* during heating. *Meat Sci* 1999; 51:237-243.
29. Townsend WE, Thomson JE, Hutchins JR. Coagulation test cooked meat temperature: effect of variations in filtration. *J Food Sci* 1984; 49:853-858.
30. Romano HE, Rubio CC. Investigación de efecto de la temperatura y de los ablandadores de carne en las reacciones de inmunoprecipitación para identificación de especies (tesis de licenciatura). México (DF). México: Facultad de Química UNAM, 1976.
31. Centro Nacional de Parasitología Animal. Procedimientos para la identificación de especie en tejidos animales. Manual de procedimientos para control de residuos tóxicos en productos de origen animal. CENAPA. SARH, 1990.
32. Daniel WW. Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences. 6th ed. Canada: John Wiley & Sons, Inc, 1995.
33. Mead GC, Richardson RI. Ciencia de la carne de ave. España: Acribia, 1999.
34. Grosh W, Belitz HD. Química de los alimentos. España: Acribia, 1985.
35. Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J. Microbiología alimentaria: aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. España: Acribia, 1994. 53-66.
36. Unidades de Análisis y Tendencias en Salud. Reporte Técnico de Vigilancia. Unidades de Análisis y Tendencias en Salud (UATS)

- Sistema de Vigilancia en Salud. (serial online) 1997 Oct (cited 2002 Nov 22); (2): (4 screens). Available from URL: <http://www.Sld.cu/instituciones/uats/uats/RTV/rtvo997.htm>
37. La guía para compradores de carne por la Nacional Association of Meat Purveyors. USA: Library of congreso Catalog card number 90-063005, 1980.
 38. Adams MR, Moss MO. Microbiología de los alimentos. España: Acribia, 1995.
 39. Borrad RG. Introducción a la microbiología moderna de los alimentos. España: Acribia, 1988.
 40. Eisen HN, Davis BD, Dubelcco R, Ginsberg HS, Wood W. Tratado de microbiología. 2nd ed. España: Salvat, 1979.
 41. Ancelle T, Bourée P, Touratier. La trichinellose: une zoonose en évolution. France: Office International des Epizooties, 1991.
 42. Sánchez PA. Carne Cerdo. Rev del Consumidor 2002; (307):44-46.
 43. Food Safety and Inspection Service. Cocinado para grupos: de seguridad alimentaria para voluntarios. Food Safety and Inspection Service (FSIS). (serial online) 2001 Oct (cited 2002 Nov 22); (3 screens). Available from URL:<http://www.fsis.usda.gov/OA/pubs/cfg/cfg7sp.htm>
 44. Cutrufelli ME, Mageau RP. Species identification field tests. USDA/FSIS Microbiology laboratory guidebook 3rd ed.[serial online] 1998 [cited 2002 Enero 13]; [23 screens]. Available from URL:<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgch18.pdf>

45. Berger RG, Mageau RP. Identification of animal species in cooked and canned meat and poultry products. USDA/FSIS Microbiology laboratory guidebook 3rd ed. [serial online] 1998 [cited 2002 Enero 13]; [17 screens]. Available from URL:<http://www.fsis.usda.gov/OPHS/microlab/mlgch17.pdf>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**8 FIGURAS. PATRONES PRODUCIDOS EN LA INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL
(MÉTODO OUCHTEERLONY)**

Fig. 1. Reacción de identidad



Fig. 2. Reacción de no identidad

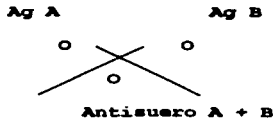


Fig. 3. Reacción de identidad parcial

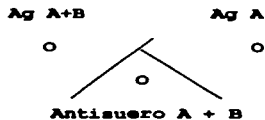
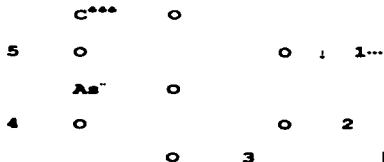


Fig. 4. Procedimiento del llenado de los pozos



* Antígeno (Ag).

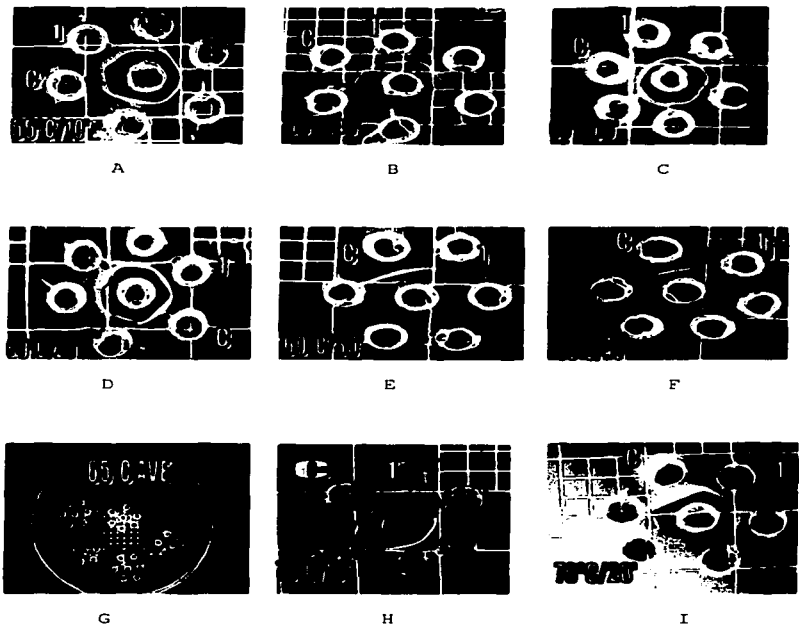
*** Antígeno control positivo (C).

---Primera repetición y la flecha indica la dirección del llenado de los pozos.

- Antisuero (As).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig. 5: A-I.* RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CARNE DE AVE POR MEDIO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY).



* Fig. 5. Líneas de precipitación de la especie de ave sometida a temperaturas de: (A) 55° C durante 10', (B) 55° C durante 40', (C) 60° C durante 10', (D) 60° C durante 20', (E) 60° C durante 30', (F) 60° C durante 40', (G) 65° C durante 10', 20', 30' y 40', (H) 70° C durante 10', (I) 70° C durante 20'.

Escala: 1cm² cuadro grande y 0.11 mm² el cuadro pequeño.

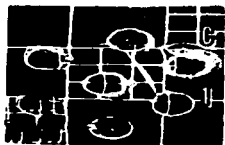
Antígeno control positivo de la especie de ave (C).

Primera repetición (1).

La flecha indica la dirección del llenado de los pozos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5: J-N.** RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CARNE DE AVE POR MEDIO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY).



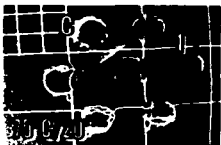
J



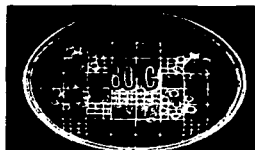
K



L



M



N

** Fig. 5. Líneas de precipitación de la especie de ave sometida a temperaturas de: (J) 70° C durante 30', (K) 70° C durante 40', (L) 75°C durante 10', (M) 75° C durante 20', (N) 80° C durante 10', 20', 30' y 40'.

Escala: 1cm² cuadro grande y 0.11 mm² el cuadro pequeño.

Antígeno control positivo de la especie de ave (C).

Primera repetición (1).

La flecha indica la dirección del llenado de los pozos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 6: A-I. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CARNE DE BOVINO POR MEDIO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY).

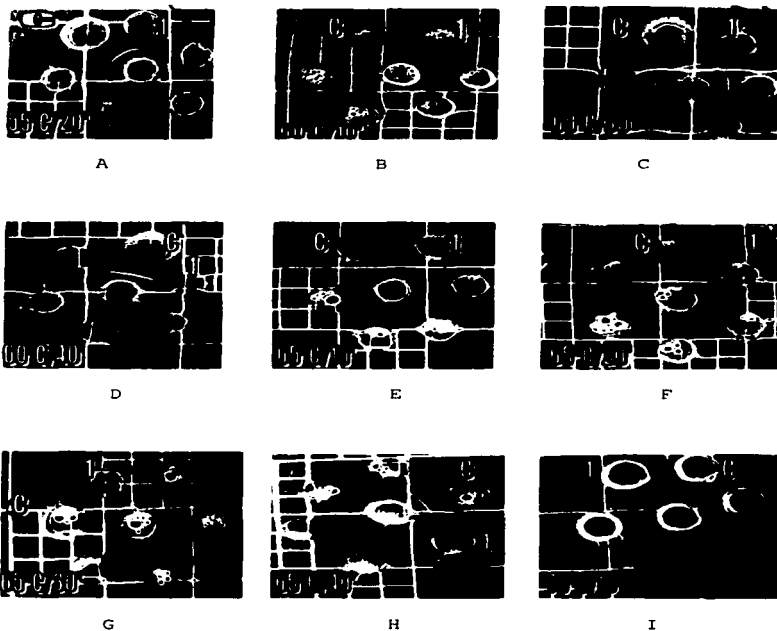


Fig. 6. Líneas de precipitación de la especie de bovino sometida a temperaturas de: (A) 55° C durante 20', (B) 60° C durante 10', (C) 60° C durante 30', (D) 60° C durante 40', (E) 65° C durante 10', (F) 65° C durante 20', (G) 65° C durante 30', (H) 65° C durante 40', (I) 70° C durante 10'.

Escala: 1cm² cuadro grande y 0.11 mm² el cuadro pequeño.

Antígeno control positivo de la especie de ave (C).

La flecha indica la dirección del llenado de los pozos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 6: J-N^{ff} RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CARNE DE BOVINO POR MEDIO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY).



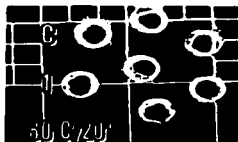
J



K



L



M



N

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

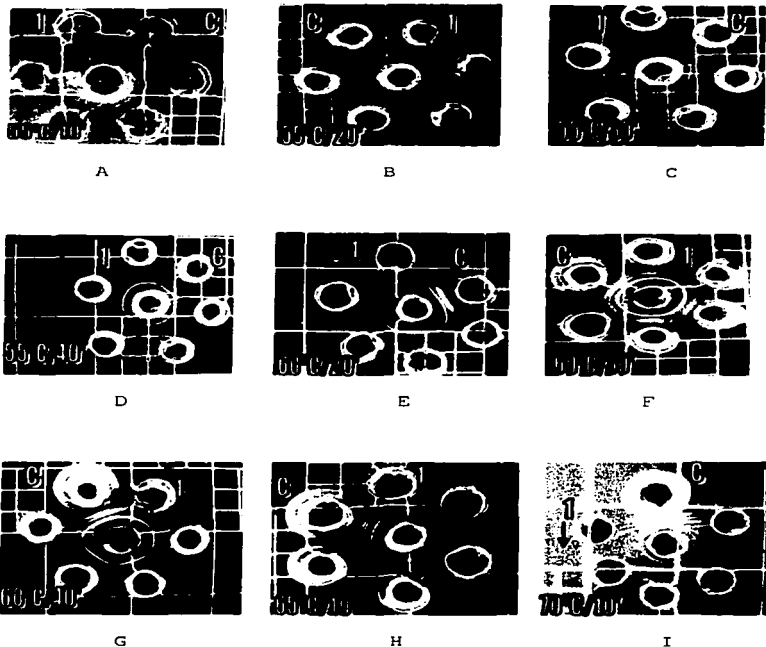
^{ff} Fig. 6. Líneas de precipitación de la especie de bovino sometida a temperaturas de: (J) 70°C durante 20', (K) 70° C durante 30', (L) 70°C durante 40', (M) 80° C durante 20', (N) 80° C durante 40'.

Escala: 1cm² cuadro grande y 0.11 mm² el cuadro pequeño.
Antígeno control positivo de la especie de ave (C).

Primera repetición (1).

La flecha indica la dirección del llenado de los pozos.

Fig. 7: A-I.* RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CARNE DE PORCINO POR MEDIO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY).



* Fig. 7. Líneas de precipitación de la especie de porcino sometida a temperaturas de: (A) 55° C durante 10', (B) 55° C durante 20', (C) 55° C durante 30', (D) 55° C durante 40', (E) 60° C durante 10', (F) 60° C durante 30', (G) 60° C durante 40', (H) 65° C durante 10', (I) 70° C durante 10'.

Escala: 1cm² cuadro grande y 0.11 mm² el cuadro pequeño.

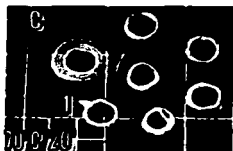
Antígeno control positivo de la especie de ave (C).

Primera repetición (I).

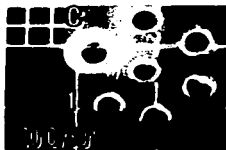
La flecha indica la dirección del llenado de los pozos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 7: J-N** RESULTADOS OBTENIDOS DE LA CARNE DE PORCINO POR MEDIO DE LA PRUEBA DE INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY).



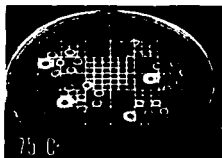
J



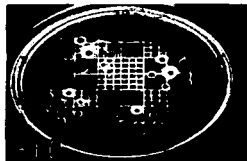
K



L



M



N

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

** Fig. 7. Líneas de precipitación de la especie de porcino sometida a temperaturas de (J) 70°C durante 20', (K) 70° C durante 30', (L) 70° C durante 40', (M) 75° C durante 10', 20', 30' y 40', (N) 80° C durante 10', 20', 30' y 40'.

Escala: 1cm² cuadro grande y 0.11 mm² el cuadro pequeño.

Antígeno control positivo de la especie de ave (C).

Primera repetición (1).

La flecha indica la dirección del llenado de los pozos.

Fig. 8

Correlación de las líneas de precipitación y temperaturas de incubación en la carne de ave con un coeficiente de correlación de 1

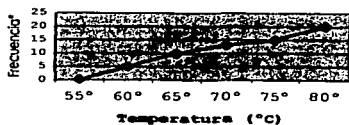


Fig. 10

Correlación de las líneas de precipitación y temperaturas de incubación en la carne de porcino con un coeficiente de correlación de 0.8257129

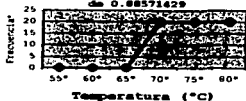
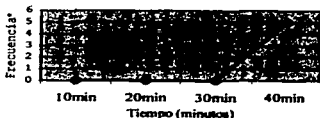


Fig. 12

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de ave sometida a 55°C con un coeficiente de correlación de 0.94285714



Frecuencia* de los resultados negativos a la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony).

Fig. 9

Correlación de las líneas de precipitación y temperaturas de incubación en la carne de bovino con un coeficiente de correlación de 0.9285714

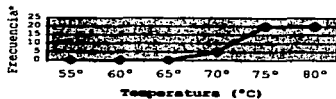


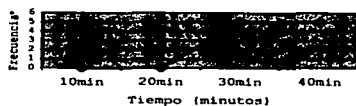
Fig. 11

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de ave sometida a 55°C con un coeficiente de correlación de 0.95714286



Fig. 13

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de ave sometida a 60°C con un coeficiente de correlación de 0.97142857



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 14

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de ave sometida a 70°C con un coeficiente de correlación de 0.98571629

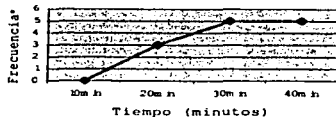


Fig. 15

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de ave sometida a 75°C con un coeficiente de correlación de 0.94285714

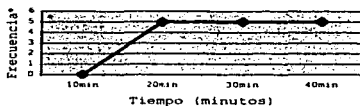


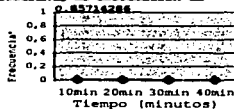
Fig. 16

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de ave sometida a 80°C con un coeficiente de correlación de 0.85714286



Fig. 17

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de bovino sometida a 55°C, 60°C 65°C con un coeficiente de correlación de 0.83716288



Frecuencia* de los resultados negativos a la prueba de Inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Fig. 18

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de bovino sometida a 70°C con un coeficiente de correlación de 0.84285714



Fig. 19

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de bovino sometida a 75°C y 80°C con un coeficiente de correlación de 0.85714286

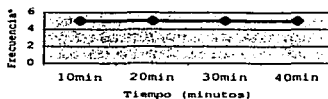


Fig. 20

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de porcino sometida a 55°C, 60°C y 65°C con un coeficiente de correlación de 0.85714286

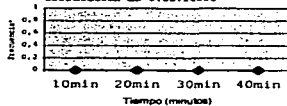


Fig. 21

Correlación de las líneas de precipitación y tiempos de incubación en la carne de porcino sometida a 70°C, 75°C y 80°C con un coeficiente de correlación de 0.85714286



Frecuencia* de los resultados negativos a la prueba de inmunodifusión doble en gel (método de Ouchterlony).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9 CUADROS

Cuadro 1

FRECUENCIA DE LOS RESULTADOS NEGATIVOS A LA PRUEBA DE IMMUNODIFUSIÓN DOBLE EN GEL (MÉTODO DE OUCHTERLONY)												
Temperatura (° C)	AVE				BOVINO				PORCINO			
	Tiempo (Min.)				Tiempo (Min.)				Tiempo (Min.)			
	10	20	30	40	10	20	30	40	10	20	30	40
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
65	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	3	5	5	0	0	0	5	5	5	5	5
75	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
80	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Cuadro 2

COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE LAS DIFERENTES TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN			
Temperatura (° C)	AVE	BOVINO	PORCINO
55	0,85714286	0,85714286	0,85714286
60	0,94285714	0,85714286	0,85714286
65	0,97142857	0,85714286	0,85714286
70	0,98571429	0,94285714	0,85714286
75	0,94285714	0,85714286	0,85714286
80	0,85714286	0,85714286	0,85714286

Nivel de significancia
0.05 - 0.029

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN