

IDENTIFICACION INMUNOLOGICA DEL MUSCULO ESTRIADO ESQUELETICO ENTRE LAS ESPECIES BOVINO Y EQUINO

CARMEN ELISA ALARCON LOPEZ* y MIGUEL GUZMAN URREGO**

Se describe un procedimiento para identificación específica de músculo equino y bovino mediante un procedimiento de doble inmuno difusión. La inespecificidad que se observa cuando se utilizan los sueros puros o a diluciones muy bajas se elimina utilizando los antisueros en una dilución mayor.

INTRODUCCION

La necesidad de proteínas de origen animal y la importancia de éstas en la nutrición, hace necesaria la aceptación por parte del hombre de tejido muscular de otras especies animales no comunes hasta ahora dentro de su dieta alimenticia como lo es la carne de caballo.

Surge entonces la inquietud acerca de cómo diferenciar entre músculo bovino y equino. Para determinar la especie animal del músculo se diseñó este trabajo, el cual utiliza una modificación del método de doble inmunodifusión de Ouchterlony para hacer una comparación cualitativa de los antisueros de cada especie. Esta prueba se fundamenta en la reacción de moléculas de anticuerpos específicos con moléculas de antígeno, cuyo resultado es la formación de un retículo insoluble antígeno-anticuerpo o inmunoprecipitina; la cual se hace visible a simple vista como una fina línea.

Antígenos: estos fueron preparados a partir de músculo bovino y equino suministrados por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional.

Antisueros: los anticuerpos fueron producidos en conejos según un esquema de inoculación de la Unidad de Inmunoquímica.

MATERIALES Y METODOS:

Los antígenos fueron preparados a partir de 250 g de músculo estriado esquelético de bovino y 250 g de músculo estriado esquelético de equino suministrados por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional. Cada uno fue fragmentado en trozos muy pequeños y luego homogenizados en un homogenizador (TALBOYS ENGINEERING CORP. Emerson N.J., modelo 134-104-2) con 250 ml de solución salina estéril. Los homogenizados fueron centrifugados a 5.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y los sobrenadantes se guardaron en volúmenes de 0,5 ml a menos 20°C, hasta su utilización.

Los antisueros antimúsculo estriado de bovino y antimúsculo estriado esquelético de equino fueron producidos en conejos machos adultos jóvenes de raza nueva zelandia. Se inoculó un animal por cada uno de los antígenos preparados durante un lapso de dos meses cada ocho días con 1 mg/ml de antígeno emulsionado en 1 ml de adyuvante de Freund por aplicación múltiple intracutánea, permitiendo una pausa de quince días en la mitad del esquema y haciendo pruebas de título de anticuerpos mediante doble inmunodifusión. Una vez obtenido un buen título de anticuerpos se procedió a sangrar los conejos por punción cardíaca. Después de la retracción del coágulo se cen-

*Unidad Inmunoquímica, Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Salud.

**Jefe Grupo de Inmunología, Instituto Nacional de Salud. Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.

trifugó la sangre a 3.000 rpm durante quince minutos a 4°C. El antisuero obtenido fue guardado en volúmenes de 2 ml y almacenado a menos 20°C.

Sobre placas de vidrio de 14 x 8 cm en una superficie nivelada, se vertió 20 ml de agarosa (merck al 1% preparada en buffer veronal 0,06 M - pH 8.6) dando origen a un gel de 0.3 cm de espesor; éste fue incubado en cámara húmeda a 4°C, durante quince minutos con el fin de completar su gelificación, luego se perforó con un patrón de geles de 7 cilindros de diámetro aproximadamente de 4 mm. En el pozo central se colocó 50 microlitros de antígeno justo hasta que desapareció el menisco. En los pozos periféricos se sirvió el mismo volumen de antisueros siguiendo el sentido de las manecillas del reloj, en diluciones dobles sucesivas. Estas diluciones fueron hechas hicieron con solución salina 0.85%.

Para observar la reacción de varios antígenos contra un mismo antisuero, se invirtió su distribución: el pozo central fue llenado con antisuero y los periféricos ocupados por los antígenos de diferentes especies animales. Luego se incubó en cámara húmeda a 4°C durante 24 horas, tiempo máximo al cual la difusión de antígenos y anticuerpos a través de los poros del gel permite visualizar la reacción; el exceso de proteínas presentes pero no reaccionantes fue eluido del gel mediante varios lavados con solución salina 0.85% durante ocho horas. Sobre cada placa se colocó papel de filtro Watman número uno húmedo, teniendo cuidado de retirar cualquier burbuja de aire entre papel y gel, evitando de esta manera el fraccionamiento del gel. Se incubó a 37°C durante una noche para deshidratarlo y conseguir una fina película; se hizo un suave lavado con agua destilada para retirar el exceso de sal. Luego las placas se sumergieron en solución colorante rojo de ponceau-s al 0,2% preparado en ácido sulfosalicílico al 3%.

Para determinar la especificidad de los antisueros se realizó una prueba de doble inmunodifusión cruzada.

RESULTADOS

Al reaccionar el antisuero antimúsculo esquelético estriado de equino con su antígeno se observó línea inmunoprecipitina hasta la dilución 1:16. (Fig.1-a).

Igualmente el antisuero antimúsculo esquelético estriado de bovino Vs su antígeno, presentó título de 1:16 U.P (unidades precipitantes) (Fig. 1-b).

Se enfrentó cada uno de los antígenos preparados ante diluciones dobles secuenciales de antisuero antimúsculo esquelético estriado de especie contraria. (Fig. 2-a y 2-b).

El antisuero antimúsculo esquelético estriado de bovino presentó reacción con el extracto de músculo esquelético estriado de equino. El título fue de 1:2 U.P. (Fig. 2-a).

Antimúsculo esquelético estriado de equino, reaccionó con el extracto de músculo esquelético estriado de bovino hasta la dilución 1:2. (Fig. 2-b).

REACCION DE UNA DILUCION 1:8 DE LOS ANTISUEROS FRENTE A SU ANTIGENO DE ESPECIE CONTRARIA.

Una dilución 1:8 del antisuero antimúsculo equino reaccionó con su antígeno específico dando como resultado un banda precipitina. (Fig. 3-a-1).

La dilución 1:8 del antisuero antimúsculo equino, no reaccionó con el extracto de músculo esquelético estriado de especie bovina. (Fig. 3-a-2).

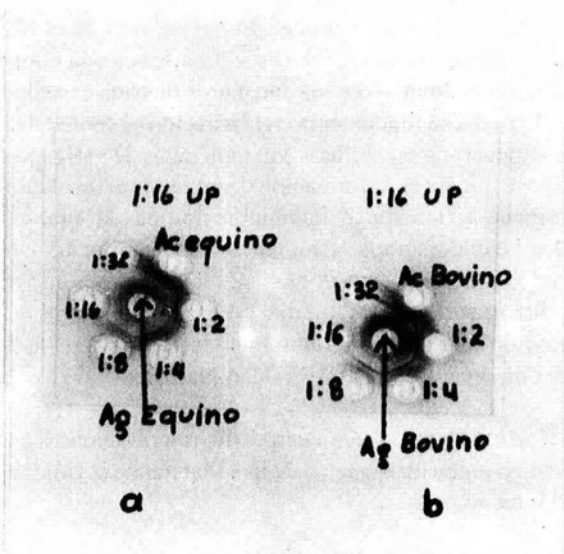


Figura 1.

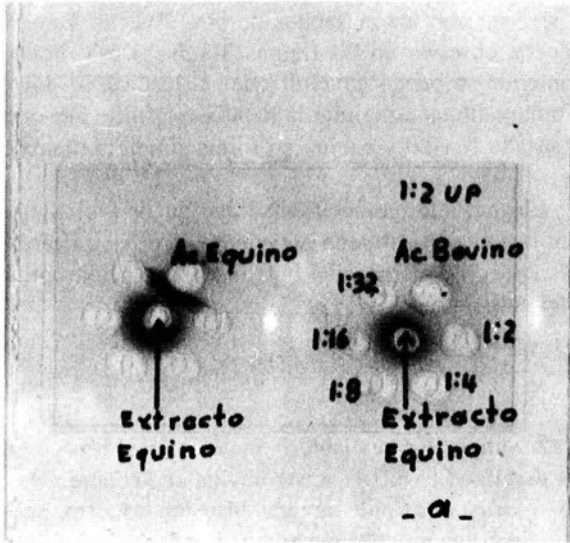


Figura 2a

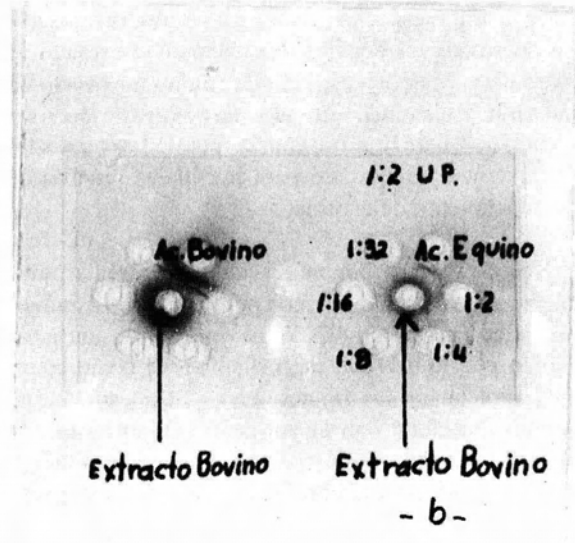


Figura 2b

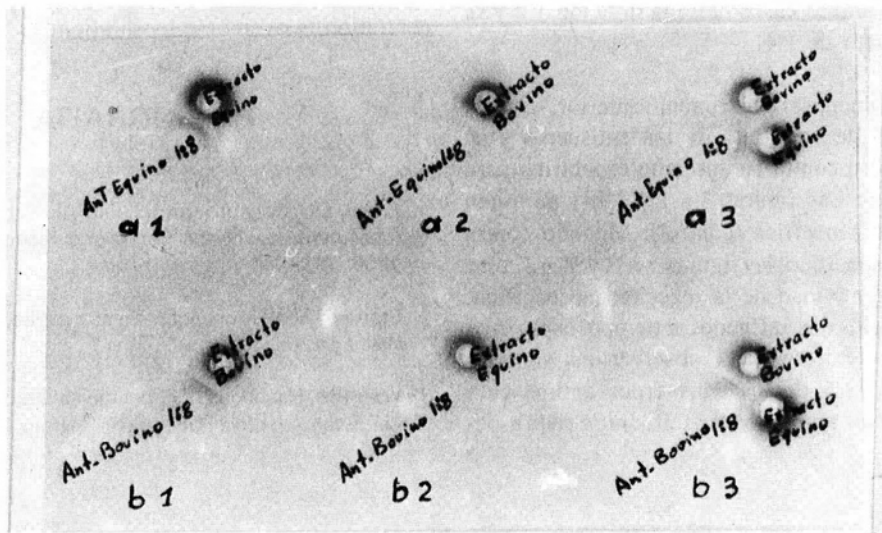


Figura 3.

La dilución 1:8 del antisuero antimúsculo equino reaccionó frente a su antígeno específico y no con el antígeno bovino. (Fig. 3-a-3).

Antisuero antimúsculo esquelético estriado de bovino en dilución 1:8, reaccionó frente a su antígeno. (Fig. 3-b-1).

La dilución 1:8 de anticuerpos de especie bovina no reaccionó frente al antígeno equino. (Fig. 3-b-2).

Anticuerpos de bovino en dilución 1:8 reaccionó frente al extracto de músculo de bovino y no frente al antígeno equino. (Fig. 3-b-3).

DISCUSION

Se sabe que los antígenos específicos de especie son transportados por las células dentro de una especie determinada, así que pueden ser reconocidos por antisueros obtenidos mediante inmunizaciones cruzadas

entre distintas especies; en la figura 1 observamos que los sueros de los conejos inoculados con extracto de músculo esquelético estriado de equino y extracto de músculo esquelético estriado de bovino respectivamente, tienen un título de anticuerpos de 1:16 unidades precipitantes. Buen dato para iniciar las pruebas de reconocimiento de especie.

No se esperaba inmunoreacción al enfrentar anticuerpos antimúsculo bovino contra antígeno equino, ni anticuerpos antimúsculo bovino contra antígeno equino puesto que son específicos; pero como podemos apreciar en las figuras 2-a y 2-b el anticuerpo bovino reaccionó con el antígeno equino hasta una dilución 1:2 del anticuerpo. Igualmente la dilución 1:2 del anticuerpo equino reaccionó con el extracto bovino.

Si observamos las figuras ya mencionadas, la reacción ocurre en ambos casos hasta la dilución 1:2 y se negativiza a partir de 1:4.

Teniendo en cuenta el experimento anterior, se tomó la dilución 1:8 de cada uno de los antisueros y se enfrentó: primero contra su antígeno específico para tener un control. Las figuras 3-a-1 y 3-b-1 permiten ver la reacción específica (control), segundo contra el antígeno inespecífico; las figuras 3-a-2 y 3-b-2 comprueban la negatividad de la reacción inespecífica, y tercero contra los dos antígenos al tiempo: específico e inespecífico donde se puede observar una vez más que la dilución 1:8 de los antisueros antimúsculo reaccionan con los antígenos específicos de cada espe-

cie y no con los antígenos de otra especie. Esto se puede observar en las figuras 3-a-3 y 3-b-3. Por lo anterior se puede concluir que: la técnica de doble inmunodifusión permite la identificación de músculo estriado bovino y equino en forma simple y rápida.

El grado de inespecificidad que puede presentarse en la reacción antígeno-anticuerpo en especies cercanas puede negativizarse buscando la dilución óptica del anti-cuerpo.

SUMMARY

A simple and reliable immunological procedure is described to differentiate bovine and equine meat. By means of a double immunodiffusion test using specific antisera produced in rabbits is possible to achieve the identification of the two species. The inespecificity which appears when the antisera is used in high concentration is overcome by dilution.

BIBLIOGRAFIA

1. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1955; 193: 265.
2. Steward MW. *Immunochemistry* ed. Ed.; Chapman and Hall. Londres: 1976.
3. Weir PM. *Handbook of Experimental Immunology* 2a. Ed, Blackwell Scientific Publications, Oxford: 1974.