

Caracterización de fracciones inmunolectroforéticas en extractos cárnicos solubles.

G. CASAS, J. TORMO y B. SANZ.

Departamento de Higiene y Microbiología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria.
Universidad Complutense. Madrid-3, España.

Para la diferenciación de carnes, procedentes de diversas especies animales, se han empleado antígenos preparados, a partir de extractos musculares o de suero sanguíneo. Los resultados de las pruebas inmunológicas efectuadas con ellos, no han sido, hasta el momento, por completo satisfactorios. En mayor o menor grado, se han detectado falsas reacciones positivas, debidas a las comunidades antigénicas cruzadas existentes entre las distintas especies animales. Por ello, hemos considerado de interés efectuar el análisis a través de la técnica de inmunolectroforesis en gel de agarosa, para estudiar las proteínas cárnicas solubles y llegar a identificar las fracciones o componentes antigénicos de cada uno de los extractos, con los que se ha efectuado este trabajo: PSB (Proteína soluble de carne de vaca), PSCA (Proteína soluble de carne de caballo), PSC (Proteína soluble de carne de cerdo), PSP (Proteína soluble de carne de perro) y PSPO (Proteína soluble de carne de pollo). Consideramos que la caracterización de los componentes mayores que sean, al mismo tiempo, específicos facilitaría extraordinariamente la diferenciación inmunológica de las carnes.

MATERIAL Y METODOS.

a) Extractos antigénicos: El tejido muscular de cada una de las especies animales, una vez liberado de las porciones tendinosas, aponeurosis y depósitos grasos se picaba finamente y se pasaba a un matraz con solución salina al 0,85%, donde se procedía a su trituración y homogeneización. La extracción de la proteína soluble se realizó en condiciones de refrigeración a 1°C. y, en constante agitación, durante 60 minutos. A continuación, se procedió al filtrado de cada uno de los preparados y a su liofilización final. Hasta el momento de su utilización, cada uno de los extractos cárnicos se conservaba en un desecador.

b) Inmunosueros: Para su obtención se emplearon conejos machos, de raza Nueva Zelanda y de 2,5-3 Kg. de peso. En cada dosis se aplicaban 48 mg. de extracto antigénico liofilizado, disueltos en 2 ml. de agua destilada y desionizada. En algunos casos, el extracto se inyectaba con Adyuvante Completo de Freund (Difco), para estimular la producción de anticuerpos. Las inoculaciones se efectuaban por vía subcutánea, aplicándose un total de 15 dosis a cada conejo, a lo largo de un período de inmunización de 62 días. Con el fin de controlar la tasa de precipitinas en suero se realizaron sangrías parciales, durante el período de tiempo que duró el proceso de hiperinmunización. Los inmunosueros obtenidos se distribuyeron en viales, a los que se adicionó azida de sodio al 0,10%, como conservador.

c) Inmunolectroforesis en gel de agarosa, según la técnica de Grabar (1.953), modificada

por Scheidegger (1.955): El gel de agarosa se preparó disolviendo, al baño maría, durante treinta minutos, 10 g. de agarosa en 1.000 ml. de agua destilada y desionizada añadiendo, posteriormente, a esta solución, 1.000 ml. de tampón veronal azida de sodio (pH 8,6). Para la electroforesis de los diversos extractos antigénicos, se utilizó un generador de tensión SHANDON modelo U-77 (SAE-2761), ajustado para conseguir una diferencia de potencial de 6 voltios por centímetro. El paso de la corriente se mantuvo durante 4 horas. Concluida la electroforesis, se llenaban las trincheras con los inmunosueros correspondientes, manteniéndose la difusión durante 18-24 horas.

Además de la coloración con Negro amida para la visualización de todos los componentes, se realizaron tinciones de caracterización inmunoquímica de glicoproteína (Método de NADI) y de lipoproteínas (Método del SUDAN negro), de las fracciones inmunolectroforéticas obtenidas en cada caso. El cálculo de las movilidades absolutas, relativas a la albúmina bovina y porcentuales de los diversos componentes, se llevó a cabo aplicando las fórmulas siguientes:

$$M. \text{ Absoluta} = \frac{\text{Desplazamiento real (cm.)}}{\text{Voltios / cm. X segundo.}}$$

$$M. \text{ Relativa} = \frac{\text{Desplazamiento real (cm.)}}{\text{Desplazamiento real (cm.) albúmina bovina.}}$$

$$M. \text{ Porcentual} = M. \text{ relativa} \times 100\%.$$

RESULTADOS

En primer lugar, se determinó la concentración óptima de los extractos antigénicos a utilizar en las pruebas, que permitiera detectar el mayor número posible de fracciones y, que diera más nitidez en las líneas de precipitación.

Para los sistemas homólogos, la dilución más adecuada resultó la 1/2, es decir, 24 mg. de extracto antigénico liofilizado por mililitro; mientras que para los sistemas heterólogos, únicamente, el extracto protéico soluble de carne de perro (PSP) se diluyó al 1/2; todos los demás antígenos se utilizaron sin diluir.

Sistema PSB anti-PSB.

<u>Fracciones</u>	<u>Movilidad porcentual</u>	<u>Mayores</u>	<u>Específicas</u>
1	9	-	+
2	20	-	-
3	31	+	+
4	40	+	+
5	44	-	+
6	89	-	+

Como se puede observar, este sistema permitió diferenciar seis fracciones, de movilidades porcentuales comprendidas entre 9 y 89. De estas fracciones, únicamente, la de movilidad 20%, era común a las demás especies. Las restantes, con la excepción de las números 4 y 5 de movilidades muy próximas (40 y 44%), son fácilmente diferenciables. Por otra parte, las fracciones de movilidad porcentual 31 y 40, que son específicas, corresponden también a componentes mayores (se tiñen más intensamente y suelen aparecer en las primeras etapas del período de inmunización). Por todo ello, las consideramos de mayor interés para diferenciar la carne de bóvido, por esta técnica.

Sistema PSCA anti-PSCA.

<u>Fracciones</u>	<u>Movilidad porcentual</u>	<u>Mayores</u>	<u>Específicas</u>
1	12	-	-
2	24	+	+
3	43	-	-
4	51	-	-
5	54	-	+
6	64	-	+
7	97	-	+

Glicoproteínas: Componentes 3 y 6

Este sistema diferenció siete fracciones. El componente de movilidad porcentual 24 es mayor y específico. La caracterización de glicoproteínas fué positiva para los componentes menores de movilidades 43 y 64%.

En relación con otros extractos, este inmunosuero presentaba comunidades antigénicas con las proteínas cárnicas de vacuno, cerdo y perro. A este respecto, la fracción de movilidad 12% es la que se repite con mayor frecuencia y, por consiguiente, la hemos considerado de gran importancia, como responsable de las falsas reacciones positivas.

En consecuencia, para la diferenciación de esta especie, atenderemos principalmente al componente de movilidad porcentual 24, que es una fracción mayor y específica, que aparece en el inmunosuero a los 28 días de iniciado el proceso de inmunización. Al de movilidad 64%, que es específico y caracterizado inmunológicamente como una glicoproteína. Al componente de movilidad 97%, que es la fracción más anódica y, además, de carácter específico. La fracción de movilidad 54%, aunque es específica, tendría menor interés, ya que, es un componente menor, que no aparece en el inmunolectroferograma hasta los 62 días del proceso de inmunización.

Sistema PSC anti-PSC.

<u>Fracciones</u>	<u>Movilidad porcentual</u>	<u>Mayores</u>	<u>Específicas</u>
1	16	+	-
2	17	-	-
3	33	-	-
4	37	+	-
5	48	-	-
6	75	+	+

Glicoproteínas: Componente 5

En este sistema se evidenciaron seis fracciones, de las cuales, tres eran componentes mayores. La fracción más importante para la diferenciación de este extracto sería la de movilidad porcentual 75 ya que, al mismo tiempo que se trata de un componente mayor, es la fracción más anódica, que presenta una situación muy alejada del componente más próximo o de movilidad 48% y, resulta fácilmente diferenciable. Es el único inmuosuero que ha permitido observar arcos de precipitación frente al extracto antigénico de proteína soluble de carne de pollo. Creemos que, la posible explicación a este resultado, un tanto anómalo, radicaría en el elevado grado de inmunización que conseguimos al inocular el extracto cárnico porcino.

Sistema PSP anti-PSP.

<u>Fracciones</u>	<u>Movilidad porcentual</u>	<u>Mayores</u>	<u>Específicas</u>
1	2	+	-
2	17	+	-
3	29	-	-
4	32	-	+
5	44	-	-
6	56	-	+
7	97	+	+

Glicoproteínas: Componente 5

En este sistema se encontraron siete fracciones. Es el extracto que presentó el componente de menor movilidad (2%), lo que indudablemente facilita su diferenciación junto a la circunscripción de que, además, es un componente mayor.

De los restantes componentes específicos, el de más interés sería el de movilidad 97%, por tratarse de una fracción mayor y específica, que aparece en el inmuosuero a los 28 días de iniciado el proceso de inmunización.

De menos importancia consideramos al componente de movilidad porcentual 56, que aunque es específico y, caracterizado inmuoquímicamente como una glicoproteína, es una fracción menor que no aparece en el inmuosuero hasta los 62 días del período de inmunización.

Sistema PSPO anti-PSPO.

<u>Fracciones</u>	<u>Movilidad porcentual</u>	<u>Mayores</u>	<u>Específicas</u>
1	17	+	+
2	29	-	+
3	44	+	+
4	62	-	+
5	79	-	+
6	85	+	+

Glicoproteínas: Componente 2

Lipoproteínas: Componente 3

Este sistema evidenció seis fracciones, pero al enfrentar el inmuosuero anti-PSPO con los demás extractos antigénicos, no se encontró ninguna línea de precipitación. Por lo tanto, debemos considerar los seis componentes como específicos.

No obstante, las fracciones más interesantes de este extracto serían, la de movilidad 44% por estar caracterizada inmuoquímicamente como una lipoproteína y ser una fracción mayor; las de movilidad 17 y 75% por ser componentes mayores y, la de movilidad 29% por corresponder a una glicoproteína.

Podemos concluir que, el análisis inmuoelectroforético de los diversos extractos cárnicos estudiados nos han permitido identificar una serie de fracciones o componentes antigénicos que, por ser mayores y específicos, dentro de los límites de nuestra experiencia, presenten

un marcado interés para valorar los resultados que puedan obtenerse al aplicar la inmuoelectroforesis a la diferenciación inmunológica de carnes, procedentes de diversas especies animales. Las movilidades inmuoelectroforéticas porcentuales, en relación a la seroalbúmina bovina, de las fracciones que han presentado estas características, son las siguientes:

PSB: 31 y 40.

PSCA: 24.

PSC: 75.

PSP: 97.

PSPO: 17, 44 (lipoproteína) y 85.

Por otra parte, consideramos que, la preparación de extractos antigénicos animales, exentos de los componentes comunes o inespecíficos, permitiría la diferenciación inmunológica de carnes por inmuodifusión en agarosa u otras técnicas serológicas basadas en la reacción de precipitación, al eliminar las posibles reacciones cruzadas.