

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**"ESTUDIO PRELIMINAR PARA LA DIFERENCIACION DE
CARNES DE CINCO ESPECIES, EMPLEANDO
UN METODO INMUNOQUIMICO"**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

ISMAEL ANTONIO LOPEZ CORDOVA

GUADALAJARA, JALISCO, 1978

A MI PADRE:

Con cariño y respeto.

A MI MADRE:

*Que con su cariño y apoyo ayudaron
a mi formación.*

A MI HERMANO MARIO:

*Con infinita gratitud y cariño, por
el esfuerzo y sacrificios con los que
llevó a la superación en esta etapa
de mi vida.*

A MIS HERMANOS:

JUAN FRANCISCO Y BERTHA

LIZ AMALIA Y MANUEL

MA. DEL CARMEN Y

FEDERICO

J. JESUS

ANA JULIA Y FRANCISCO J.

MA. DOLORES Y FEDERICO

MA. DE LOS ANGELES Y

JOAQUIN

MARCO ALONSO Y ARACELI

CON ADMIRACION Y RESPETO

*Al Dr. Ramón Fernández de
Cevallos
Fundador y ex-Director de
esta Facultad.*

*AL M.V.Z. ENEAS W.
RENDON R.
Padrino de la VII generación a la
cual pertenezco.*

*AL M.V.Z. JAVIER RIVERA
HERNANDEZ
Con respeto y admiración.*

*AL PERSONAL DEL
LABORATORIO DE
BIOQUIMICA*

Por su apoyo y colaboración.

*AL M.V.Z. HIRAM OSIRIS
GONZALEZ C.*

Por su amistad y gran ayuda brindadas durante mis estudios en esta Facultad.

*AL DR. SERGIO A. ZAMBRANO
VILLA*

*y colaboradores del Lab. de Inmunología de Especialidades Médicas del I.M.S.S.
por la gran ayuda brindada.*

A MI ASESOR:

*Q.F.B. CARMEN YOLANDA
PARTIDA O.*

*Quien con su apoyo y capacidad me
llevaron al término y realización de
este trabajo.*

A MI HONORABLE JURADO:

*M.V.Z. Jaime Aranda Velasco.
M.V.Z. Roberto Salgado Rodríguez.
M.V.Z. Eduardo Nevares Salas.
ING. Juan Pulido Rodríguez.
M.V.Z. Luis E. Espinoza Páez.*

A MIS MAESTROS

A MIS AMIGOS

*A MIS COMPAÑEROS
DE LA VII GENERACION*

C O N T E N I D O

INTRODUCCION

MATERIAL

METODOS

RESULTADOS

DISCUSIONES

CONCLUSIONES

RESUMEN

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

INTRODUCCION

Ya que en México no contamos con una legislación bien establecida para control de productos cárnicos de consumo humano como la hay por ejemplo en Alemania, se fijó como objetivo del presente trabajo, la aplicación de un método inmunoquímico para hacer la diferenciación de carne fresca de cinco especies de mamíferos, con el fin de evitar fraudes y para fines de veterinaria legal.

Las carnes de los mamíferos pueden ser diferenciadas principalmente por: el color y la forma característica de la estructura ósea y de los músculos, sin embargo muchas veces es difícil hacer una diferenciación para detectar fraudes, especialmente cuando se tiene un fragmento de carne de dos especies que tienen ciertas características anatómicas comunes como tamaño, forma, color, etc. (6, 13, 14).

La prueba de glicógeno, basada en la hipótesis de que la carne de caballo contiene más de este polisacárido que cualquier otra carne, no es concluyente, ya que, la carne de fetos, vacas paridas mal alimentadas y el hígado de cerdo especialmente, también lo contienen en buena cantidad (6). Además, el porcentaje de glicógeno en carne de caballo no es estable, esto pasa frecuentemente con las demás carnes. La presencia de este polisacárido no constituye una guía (6).

Se pueden utilizar métodos químicos, histológicos y serológicos (inmunoquímicos). El valor de la investigación histológica es limitada ya que, estructuras típicas en la musculatura de los mamíferos no ha sido comprobada, aunque sí en los crustáceos. Es posible caracterizar proteínas nativas en soluciones acuosas por electroforesis. (14)

El método más empleado para identificar las proteínas de las diferentes especies es el serológico (inmunoquímico). Al principio de este siglo este método fue introducido por Paul Uhlenhuth (14), y es conocido como la diferenciación biológica de proteínas; su esencia consiste en que cuando a un organismo se le aplica por vía pa-

reneral una substancia extraña reacciona produciendo anticuerpos contra esa substancia.

Estos cuerpos inmunes reaccionan en forma característica contra antígenos homólogos. Esa reacción típica puede verse "in vitro". Al respecto cabe decir que se trata de las reacciones llamadas de parentesco, es decir, que las proteínas que en sentido zoológico o de especies que están cerca se comportan más o menos en forma similar. (14)

La medición del valor de un antisuero se basa en la cantidad de anticuerpos y su especificidad, es decir, con la capacidad de reaccionar sólo con los antígenos homólogos. (14)

El método más preciso para diferenciar las carnes en el laboratorio es el de la precipitación (13). Existen otros métodos de laboratorio como por ejemplo, la diferenciación de carnes determinando las constantes de grasas de las mismas, pero este método es más complicado e inexacto que la prueba de precipitación. (13)

En la prueba de precipitación para la diferenciación de carnes intervienen una precipitina (Ac), que siempre es conocida y el precipitinógeno (Ag), que siempre es desconocido (6). Esta prueba también tiene cierta desventaja que es: La de dar en algunos casos reacciones cruzadas; sin embargo se debe indicar que si uno cuenta con la precipitina ya preparada es de fácil realización. (6)

El método biológico, basado en una precipitación de proteínas específicas, aunque de ninguna manera perfecta, merece ser tomada en consideración, principalmente como una aplicación práctica.

La reacción de precipitinas la señaló Kraus por primera vez en 1897 (4). En pocos años se produjeron anticuerpos precipitantes para un gran número de proteínas provenientes de animales, plantas y bacterias, y se emprendieron estudios de interés teórico, médico-legal y filogenético. El empleo de la prueba de precipitina para estudiar relaciones entre animales se inició poco después de descubrir la reacción (4). Myers comprobó que los anticuerpos contra globulina de carnero precipitaban la globulina de carne de buey menos intensamente que la de carnero; inversamente, la globulina anti-buey reaccionaba menos fuertemente con globulina de carnero que con antígeno homólogo (4).

Las pruebas de precipitación llevadas a cabo con antisueros contra varios animales domésticos o silvestres permiten establecer si la carne molida sólo contenía bovino, o si había sido adicionada de carne "extraña" (1), por lo tanto por medio de esta prueba se nos permite reconocer la adición a la carne de bovino de carne de diferente calidad y además la utilidad de prestarse a diversas modificaciones con fines determinados (1,4).

De las reacciones antígeno-anticuerpo, la precipitación es la más sencilla (14). Entendiéndose por precipitación al proceso de unión entre Ag-Ac dando un precipitado visible a consecuencia de la reacción. Para llevarla a efecto es necesario extraer sustancias precipitables o capaces de reaccionar serológicamente (14).

La precipitación y la aglutinación son dos aspectos realmente de la misma actividad (8). Sin embargo las reacciones de precipitación o aglutinación pueden no observarse siempre que se mezclen las mismas clases de Ag y Ac.

La precipitación será mayor o menor, según la proporción entre el antígeno y el anticuerpo que se encuentran en solución o en el suero de estudio (8, 12).

Si hay exceso de anticuerpo o antígeno, la precipitación será menor; en cambio, si se encuentra en proporciones adecuadas, la precipitación será máxima (8, 12).

El sistema tiene aplicaciones para detectar anticuerpos contra moléculas proteicas o antígenos no celulares (12). Puede suceder la inhibición si la prueba de precipitación se realiza mezclando completamente los dos compuestos; si así se hace, deben ensayarse diluciones seriadas de uno de los componentes para tener la seguridad de que la reacción positiva no está enmascarada (8).

Si se dispone que la precipitación se produzca en un medio gelificado como el agar u otros geles (14, 8), puede obtenerse una mayor información y pueden realizarse análisis y determinación cuantitativa de antígenos y anticuerpos que pueden hacerse visibles por este método y además, se logra un ordenamiento de los componentes de acuerdo al grupo de sustancias a que pertenecen (14, 8).

Otros métodos para la identificación serológica de proteínas aparte de la precipitación son de significado: Reacción de fijación

de complemento, reacción anafiláctica y la hemoaglutinación indirecta que la ha utilizado Hermann para identificar proteínas de huevo y leche en productos cárnicos (14).

Diversos autores han reportado el empleo de conejos para la preparación de antisueros (1, 4, 6, 7, 8, 12, 14). Keiss y Morrison y Fenestermacher y Pomeroy (13), describieron un método para la preparación de antisueros que consiste en emplear gallos los cuales de acuerdo con ellos dan títulos de precipitación superiores a la de los conejos (13).

La obtención de un suero altamente específico exige como condición una purificación bien hecha de la substancia utilizada como antígeno sin embargo, se producen generalmente mezclas con los antisueros de cuerpos proteicos que son los que determinan el éxito de la reacción si los hay específicos (14). Para el fin de la diferenciación serológica se emplea un suero sanguíneo.

Para que el animal pueda tener una mejor receptividad, el suero tiene que ser "inactivado", es decir, calentado a 56 grados centígrados durante 20 minutos (14).

También se puede utilizar para inmunizar, líquidos corporales que contengan proteínas; sobre todo jugo muscular o extractos musculares los cuales de muchas maneras pueden ser modificados. Esto sucede por calentamiento o por acción del alcohol, lo que se comprobó ser eficaz y necesario para evitar reacciones anafilácticas en animales de laboratorio (14).

Virgilio La Rosa y Manuel Moro S. (13), emplearon 22 pollos de la raza New Hampshire en buen estado de salud que tenían tres meses de edad, a los cuales inocularon como antígeno suero de alpaca, llama, vicuña, perro, caballo, gato, ovino, cerdo, bovino, caprino y hombre, llegando a las siguientes conclusiones:

Las carnes de: alpaca, llama, vicuña, carnero y cabra no se pueden diferenciar con la prueba de precipitación.

Las carnes de: alpaca, llama, vicuña, carnero y cabra se pueden diferenciar de las carnes de vacuno, caballo, cerdo, perro, gato, puma y tigrillo.

Las carnes de: vacuno, caballo, cerdo, perro y gato se pueden diferenciar entre sí (13).

M A T E R I A L

- A) BIOLÓGICO.—Pollos de engorda de 10 semanas de edad.
Carnes de: bovino, equinos, asno, caprino y canino.
Antisueros de: Bovino, equino, asno, caprino y canino.
- B) REACTIVOS.—Sol, salina concentrada
Sol, salina normal
Hidróxido de sodio
Acido clorhídrico
Acido sulfúrico
Sulfato de cobre
Sulfato de sodio
Hidróxido de aluminio
Merthiolate 1:10,000
Sol. Buffer pH 8.2-8.4
Acido acético al 5%
Alcohol metílico
Dietil-Barbiturato
Acetato de sodio trihidratado
Agar purificado
- COLORANTES.—Ponceau en ácido tricloroacético
Rojo de metilo
- C) DE LABORATORIO.—Vasos de precipitado
Tubos de ensaye
Tubos capilares
Tubos de centrífuga
Pipetas volumétricas
Probetas
Buretas
Matraces Erlenmeyer
Matraces Kjendahl
Varillas de cristal

Mortero de porcelana
Tiras de acetato de celulosa
Papel filtro
Embudos

D) APARATOS.—Balanza analítica
Centrífuga
Aparato de digestión y destilación
Estufa de incubación
Fuente de poder
Cámara electroforética
Densitómetro con graficador
Espectrofotómetro
Potenciómetro

M E T O D O S

PREPARACION DE ANTIGENOS.—Se pesaron 30 gramos de carne de cada especie, se cortaron en trozos pequeños y se trituraron en un mortero (cada una por separado); se colocaron en vasos de precipitado y se diluyeron en 50 ml. de solución salina concentrada, se metieron al refrigerador de 14 a 18 horas para la extracción de proteínas específicas; se sacaron y se filtraron de 2 a 3 veces hasta la obtención de un filtrado más o menos claro. El filtrado resultante se trató aplicando como adyuvante hidróxido de aluminio estéril al 10%, 5 ml. a cada uno, además como preservativo se utilizó merthiolate blanco 1:10,000, 1 ml. por cada 9 ml. de filtrado (2.2 a 2.7 ml.), se envasaron en frascos estériles y se sellaron conservándose en refrigeración.

TITULACION DEL ANTIGENO.—Se determinó concentración total de proteína a cada uno de los inóculos por el método de Kjendahl (2) y por el método del Biuret (11); dando concentraciones superiores al 2%.

APLICACION DEL ANTIGENO.—El antígeno se aplicó a pollos de engorda de 10 semanas de edad, utilizando 3 pollos por especie antigénica, con aplicación de 1 ml por vía subcutánea, en cinco aplicaciones con intervalo de 7 días entre cada una.

SANGRADO DE LOS ANIMALES.—Después de 7 días a la última aplicación del antígeno se hizo un sangrado preliminar sacando de la vena del ala 5 cm. para ver titulación de sueros, una vez efectuada se sangraron totalmente.

TITULACION DE SUEROS.—Se efectuaron diluciones desde 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:28, 1:128, 1:256 y 1:512 para hacerse reaccionar con los antígenos homólogos y observar títulos.

Además se corrieron por medio de electroforesis para graficarse con ayuda del densitómetro con el método siguiente:

- 1).—Se toma una tira de acetato de celulosa y se coloca en una solución Buffer 8.2 para expansión de los poros.
- 2).—Se quita el exceso de solución con papel filtro.
- 3).—Se aplican las muestras sobre las tiras de acetato con un aplicador especial.
- 4).—Se coloca en cámara electroforética y se deja correr durante 20 minutos a 200 voltios.

- 5).—Se saca de la cámara y se pone en colorante Ponceau durante 10 minutos.
- 6).—Se quita el exceso del colorante con ácido acético al 5%.
- 7).—Fijar durante 5 minutos en alcohol metílico.
- 8).—Deshidratar con ácido acético alcohólico (alcohol metílico) al 10% durante un minuto.
- 9).—Fijar en portaobjetos.
- 10).—Secar en estufa a 37 grados centígrados durante 10-15 minutos.
- 11).—Sacar y graficar para observar concentración de albúmina, alfa 1, alfa 2, beta y gamma globulinas (9).

PRUEBA DE PRECIPITACION

A) TUBO DE ENSAYE.—Se colocaron en el fondo de cada tubo 0.1 ml. de antisuero y por las paredes de los mismos 0.2 ml. de su antígeno correspondiente de cada especie, se observó a los 30 y 60 minutos. También se hizo reaccionar cada antisuero con antígeno de las otras cuatro especies diferentes.

B) TUBO CAPILAR.—Se llenó hasta un tercio del tubo capilar con antisuero y un tercio de antígeno homólogos dejando una serie completa a temperatura ambiente y otra serie en incubación a 37 grados centígrados.

Se repitió la misma operación mezclando antisueros con antígenos heterólogos para prueba de posible reacción cruzada.

INMUNOELECTROFORESIS.—Primeramente se preparó una solución Buffer con 13.38 gramos de Dietil-barbiturato y 8.83 gramos de acetato de sodio trihidratado y se llevó a una cantidad total de 1.5 l. ajustándose a un pH de 8.2. Enseguida se preparó el gel con agar purificado con la solución Buffer al 1.5% en proporción de 1:10, se aplicó a las placas 5 ml. a cada una; una vez solidificado se hicieron las perforaciones (una canaladura y dos orificios laterales) con perforador especial, se sacó el gel de los orificios los cuales se llenaron con el antígeno. Previamente se colocó en la cámara para electroforesis la solución Buffer 1:2, se pusieron las placas dentro y se corrieron los antígenos ajustando la fuente de poder a 60 voltios durante una hora, pasada la cual se sacaron las placas y se quitó el gel de la canaladura en donde se colocó el antisuero y se dejaron en cámara húmeda durante 24 horas. Como controles positivos se utilizaron suero y antisuero humano.

RESULTADOS

La técnica empleada en la preparación de antígenos fue hasta cierto punto satisfactoria dado que, como inóculos, estimularon la formación de anticuerpos, aunque en mediana concentración contra cada especie antigénica.

Al efectuar la cuantificación de antígenos para ver concentración de proteínas, ésta fue superior al 2%, cantidad considerada como suficiente (3), para la estimulación del sistema inmunocompetente en la formación de anticuerpos (gráfica No. 1).

La cantidad de inóculo aplicada, la vía de administración empleada, así como el número de aplicaciones realizadas fueron suficientes para la obtención de títulos capaces de provocar reacción al efectuar las pruebas una vez que se hizo el sangrado preliminar por lo que, posteriormente se sangraron totalmente para la obtención de mayor cantidad de suero.

En cuanto a la titulación de los antisueros, en diluciones que oscilan entre 1:1 y 1:512, se hicieron reaccionar con sus antígenos homólogos y se obtuvieron diferentes niveles de precipitación en todas las diluciones efectuadas, siendo más visibles en canino y caprino, aunque en las últimas diluciones la reacción fue aún más débil no obstante, no dejó de apreciarse en todas ellas (cuadro No. 1).

Aparte de esta titulación, los resultados obtenidos al graficarse por medio del densitómetro fueron bastante claros al registrarse las fracciones de globulinas, obteniéndose un porcentaje apreciable de ellas especialmente de gammaglobulinas, siendo éstas, en donde se encuentran principalmente los anticuerpos (gráfica No. 2).

Los resultados obtenidos en las pruebas de precipitación efectuadas fueron los siguientes:

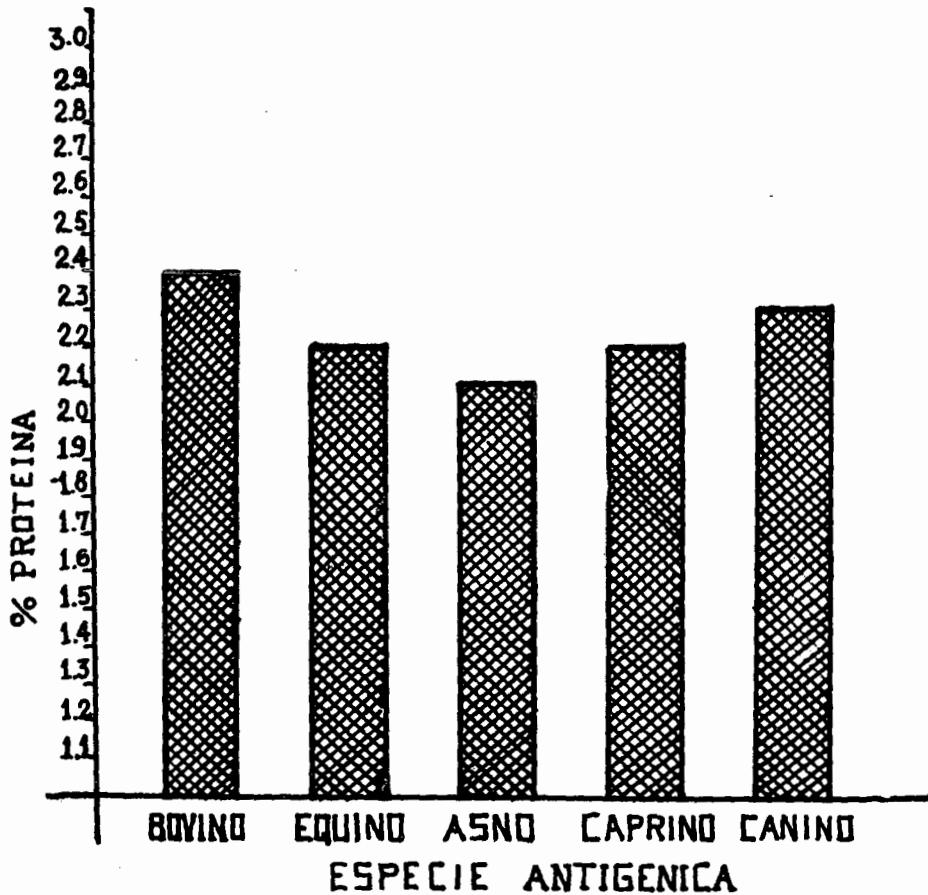
La prueba en tubo de ensaye en las reacciones tanto en forma homóloga como heteróloga los resultados fueron negativos.

En tubo capilar en cambio, la prueba resultó más efectiva puesto que, al hacer reaccionar antisueros y antígenos homólogos el resultado fue positivo; mientras que, al efectuarse con antisueros y antígenos heterólogos hubo reacción cruzada (cuadro No. 2).

La inmunoelectroforesis como método más sensible en opinión de algunos autores, se utilizó en este estudio aunque surgieron fallas como: Mediana respuesta inmune y reacciones cruzadas.

GRAFICA N° 1

CUANTIFICACION PROTEICA DEL ANTIGENO

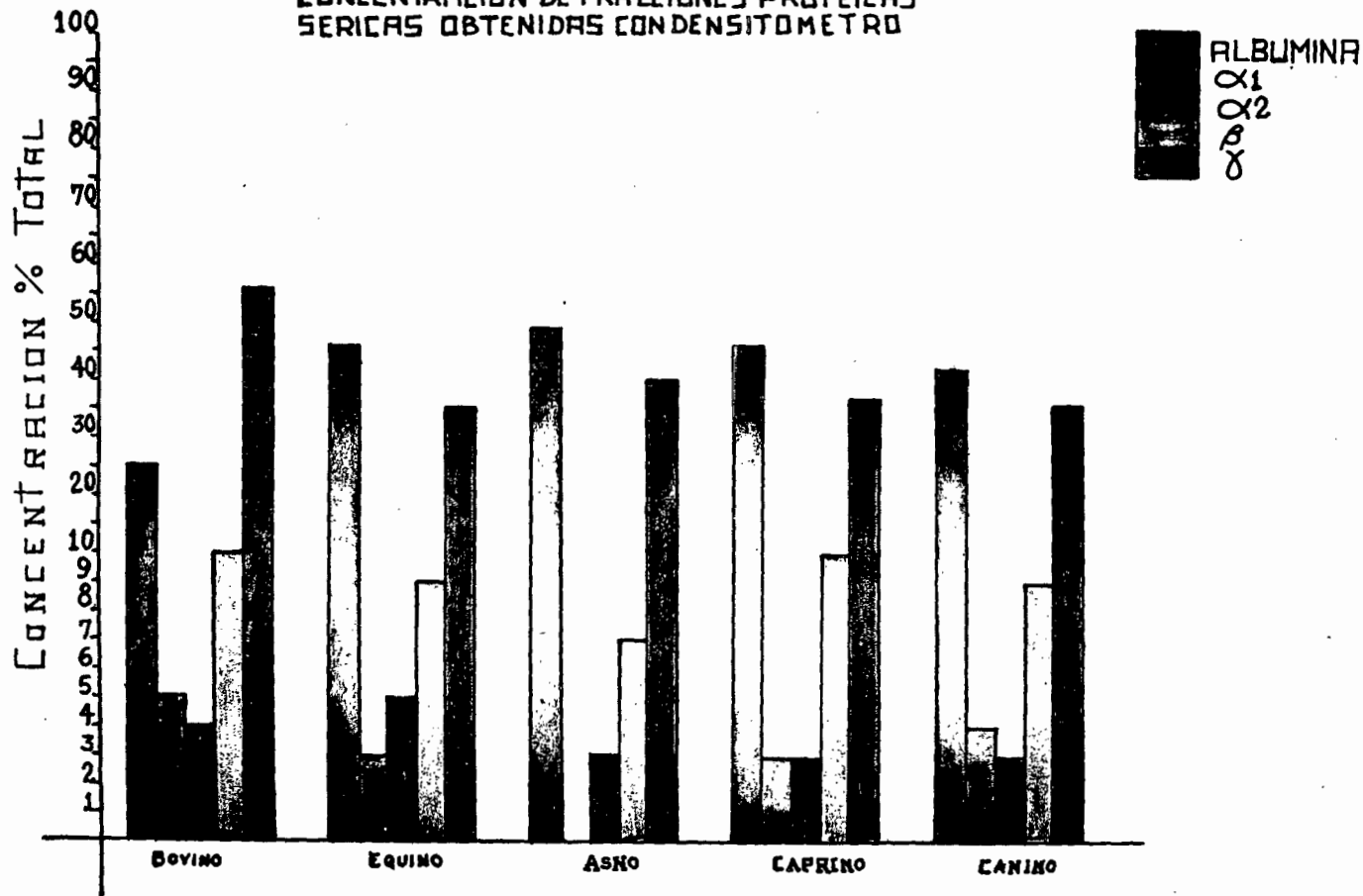


NORMALES DE FRACCIONES PROTEICAS

% DE LA PROTEINA TOTAL				
ESPECIE	Albumina	α	β	δ
BOVINO (10)	44	14	11	31
EQUIDEOS (10)	40	16	23	21
CAPRINO (10)	42	18	9	31
CANINO (5)	41.3	α_1 6.8 α_2 12.3	β_1 7.3 β_2 20.9	11.7

GRAFICA N° 2

CONCENTRACION DE FRACCIONES PROTEICAS
SERICAS OBTENIDAS CONDENSITOMETRO



REACCIONES Ag-Ac
OBTENIDAS CON ANTISUEROS HOMOLOGOS y HETEROLOGOS

CUADRO N°2

ESPECIE ANTIGENICA	A N T I S U E R O S				
	BOVINO	EQUINO	ASNO	CAPRINO	CANINO
BOVINO	+	+	+	+	+
EQUINO	+	+	+	+	+
ASNO	+	+	+	+	+
CAPRINO	+	+	+	+	+
CANINO	+	+	+	+	+

DISCUSIONES

La elección de la especie utilizada para la obtención de antisue-
ros, se llevó a cabo de acuerdo a la opinión de los autores Keiss y
Morrison y Fenestermacher y Pomeroy.

En oposición a la opinión de los citados autores, la mayoría de
los investigadores se inclina por el conejo como la especie idónea
para este tipo de trabajo; sin embargo se optó por emplear aves
para la corroboración a la opinión compartida por los autores men-
cionados.

En la preparación de antígenos se utilizó como adyuvante el hi-
dróxido de aluminio, aunque se considera que el adyuvante com-
pleto de Freund es mejor y se obtienen mejores resultados.

Dado que la capacidad antigénica del extracto cárnico utiliza-
do, guarda estrecha relación con el contenido proteínico del mismo,
se procedió a efectuar su cuantificación utilizando el método del
Biuret y el de Macro Kjendahl, obteniéndose un porcentaje consi-
derado como suficiente. Por la cuantificación realizada deduzco que
sería más conveniente la utilización de extractos antigénicos más
concentrados con un porcentaje superior al recomendado y además
purificados.

En cuanto a la vía de administración, cantidad de inóculo y nú-
mero de aplicaciones; considero hayan sido las adecuadas.

En lo concerniente al grado de la respuesta inmune, ésta se
puso de manifiesto en el resultado obtenido en la titulación de los
antisuecos. Dicha respuesta considero hasta cierto punto fue sa-
tisfactoria; apreciándose, como es obvio, diferencias en la respuesta
inmunológica en las diferentes especies animales.

La graficación de los antisuecos llevada a cabo mediante el
densitómetro, nos registró las fracciones de globulinas, en especial
las gamma, importantes, en cuanto que, es la fracción donde prin-
cipalmente se encuentran los anticuerpos.

Los resultados negativos obtenidos en la prueba realizada en
tubos de ensaye se debieron tal vez a que este método que corres-

ponde a las pruebas de precipitación simple y además, puesto que se produce una ligera mezcla en la interfase se haya presente una gamma de diferentes proporciones de anticuerpo y antígeno y no es raro que haya inhibición de la precipitación como consecuencia del exceso de cualquiera de ellos.

La prueba en tubo capilar nos dio resultados más convincentes debido a que en este método la precipitación es más apreciable dado que las proporciones utilizadas tanto del antígeno como la del antisuero están concentradas y son más adecuadas para la obtención de resultados más satisfactorios.

Aunque la inmunoelectroforesis considera como uno de los métodos de precipitación más sensibles, en el presente estudio no se obtuvieron resultados satisfactorios, debido a que, los extractos utilizados como antígenos no llenaban las condiciones requeridas para el caso como serían: Mayor concentración proteínica, así como una mayor purificación para su correspondiente especificidad; evitando con ello la obtención de una mediana o nula respuesta inmune y además las reacciones cruzadas.

C O N C L U S I O N E S

- 1.—La especie utilizada como fuente productora de anticuerpos no fue lo suficientemente adecuada para darnos una respuesta inmune satisfactoria.
- 2.—La utilización de hidróxido de aluminio como adyuvante no proporcionó el resultado deseado tomando en consideración que el adyuvante completo de Freund es el más adecuado en estos casos.
- 3.—Por lo expuesto en discusiones, respecto al contenido proteínico del antígeno, juzgo conveniente el empleo de un nivel superior al que se determinó en el extracto utilizado.
- 4.—Vía de administración, cantidad y frecuencia en la aplicación del antígeno fueron satisfactorias.
- 5.—La respuesta negativa por el método del tubo de ensaye fue debida a que las concentraciones tanto del antígeno como del anticuerpo no eran equivalentes.
- 6.—Obtuvimos mejores resultados en tubo capilar ya que, por este método, tanto la proporción como la concentración de antígeno y anticuerpo fueron más adecuadas.
- 7.—Como método más sensible la inmunoelectroforesis necesitaría precisamente, antígenos y anticuerpos debidamente procesados para su utilización en esta práctica.

RESUMEN

La realización del presente trabajo, tuvo como objetivo la aplicación de un método inmunoquímico para hacer la diferenciación de carne fresca de cinco especies de mamíferos, con el fin de evitar fraudes y para fines de Veterinaria Legal.

El método inmunoquímico utilizado fue el de precipitación.

Como fuentes productoras de anticuerpos se utilizaron pollos de engorda de 10 semanas de edad.

Utilizamos extractos de carnes de: bovino, equino, asno, canino y caprino como material antigénico.

La vía empleada para la aplicación del antígeno fue la subcutánea en cantidad de 1 c.c. con frecuencia de 7 días y un total de cinco aplicaciones.

Se cuantificó la proteína del antígeno empleando para ello el método del Biuret y el Macro-Kjendahl.

La titulación de antisueros se realizó mediante diluciones desde 1:1 hasta 1:512, utilizando como diluyente solución salina normal.

Para las pruebas de precipitación se utilizaron los siguientes métodos: Pruebas en tubo de ensaye; prueba en tubo capilar e inmunoelectroforesis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—BARRET, James T. **Inmunología**, México, C.R.A.T. 1972, pp. 99, 102.
- 2.—BATEMAN John V. **Nutrición Animal**, México, C.R.A.T. 1970, p. 468.
- 3.—CAMPOS H., Juan Manuel. “La prueba de intradermorreacción en el diagnóstico de fasciolosis bovina y su correlación con hallazgos post-mortem”. Tesis M.V.Z., Guadalajara, U. de G., 1973, s. p.
- 4.—CARPENTER, Philip L. **Inmunología y Serología**. México, La Prensa Médica Mexicana, c. 1963, pp. 127, 141.
- 5.—CATCOTT, E. J., SMITHCORS, J. F. **Progress in canine practice**. Sta. Bárbara, American Veterinary Publications, 1967, p. 729.
- 6.—GINSBERG, A. “The differentiation of meats by Precipitation test. *Veterinary Record*. **60** (52): 683-685, 1948.
- 7.—HAYDEN, Alonza R. “Detection of chicken flesh in beef sausages”. *Journal of Food Science*. **42** (5): 1189, 1977.
- 8.—HERBERT, W. J. **Inmunología Veterinaria**. Zaragoza, Acribia. 1972, pp. 151, 152, 157.
- 9.—I.M.S.S. Laboratorio de Inmunología, Referencia Personal.
- 10.—KOLB, Erich et al. **Fisiología Veterinaria**. España, Acribia, 2a. Ed., 1967, p. 435.
- 11.—MERCKOTEST. Proteínas Totales; Método del Biuret (Instructivo).
- 12.—ROJAS M. William. **Inmunología**, 3a. Ed. México. Ed. Colina, 1976, p. 128.
- 13.—ROSA, Virgilio 1a., MORO S., Manuel. “La prueba de precipitación en la diferenciación de las carnes de los mamíferos”. *Revista de la Fac. de Med. Vet. U. Nacional Mayor de San Marcos*. **13-14** (s. n.): 158-168, 1945.
- 14.—SINELL, H. J. “Tierspezies-Identifizierung mittels serologischer methoden”. *Fleischuntersuchung*. Berlín; Springer-Verlag, 1968, pp. 1239-1266.