

FERNANDA DE MELO LIMA BRUGNANO

**Identificação da espécie animal em amostras de carne
através da reação em cadeia pela polimerase: o método de
controle de fraudes em alimentos**

São Paulo

2010

FERNANDA DE MELO LIMA BRUGNANO

**Identificação da espécie animal em amostras de carne através da
reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes
em alimentos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2254
FMVZ

Brugnano, Fernanda de Melo Lima

Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos / Fernanda de Melo Lima Brugnano. -- 2010.

113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.
Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian.

1. Inspeção dos produtos de origem animal. 2. Saúde pública. 3. PCR. 4. Vigilância Sanitária de Alimentos. 5. Fraude em alimentos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão de Ética no uso de animais



PARECER

Interessado: Fernanda de Melo Lima Brugnano

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, reunida no dia 20/01/2010, analisou o projeto protocolado sob o número 1866/2009, intitulado: "Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método como controle de fraudes em alimentos", no qual foram utilizadas cinco amostras de carne (bovina, suína e canina), totalizando 15 amostras, fornecidas pela Vigilância Sanitária, sob a responsabilidade da Profa Dra Simone de Carvalho Balian, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de ética adotados por esta Comissão.

São Paulo, 21 de janeiro de 2010

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BRUGNANO, Fernanda de Melo Lima

Título: Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu querido esposo, **Waldemar Brugnano Júnior**, ao meu filho precioso,
Enrico de Melo Brugnano, pela paciência, apoio e amor.

A minha mãe, **Vera Luzia Sargo de Melo Lima**, pelo incentivo e exemplo de
persistência e dedicação aos estudos.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora **Profa. Dra. Simone de Carvalho Balian**, pela confiança, incentivo, amizade. Enfim, pelo ser humano especial e iluminado que é...

Ao **Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão**, a quem considero também como orientador... pelos ensinamentos, apoio contínuo, paciência, sugestões e pelo grande exemplo.

Ao **Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain** por ter me permitido fazer parte do Labmas.

À **Profa. Dra. Evelise de Oliveira Telles**, pela atenção, ajuda nos momentos difíceis, sugestões e amizade.

Ao **Prof. José Antonio Jerez**, por quem tenho grande admiração, pela amizade e apoio para iniciar o mestrado.

Ao **Prof. Dr. Pedro Manuel Leal Germano**, da Faculdade de Saúde Pública, pelos valiosos ensinamentos. Desde 2004, com a Especialização em Vigilância Sanitária de Alimentos, contribuiu para meu interesse e paixão pela área.

À **Dra. Evanise Segala Araújo, Dra. Andréa Barbosa Boanova, Dra. Celina Barbosa da Silva Dinitzen**, da Coordenação de Vigilância em Saúde, do Município de São Paulo, pela receptividade, amizade e parceria.

Aos técnicos **Sheila Oliveira de Souza Silva, Orlando Bispo de Souza, Sandra Abelardo Sanches e Gisele Oliveira de Souza**, pela colaboração e amizade.

Prof. Dr. Glavur Rogerio Matté e Profa. Dra. Maria Helena Mattté, da Faculdade de Saúde Pública, pelo conhecimento e aulas sem igual.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares**, pelas importantes sugestões.

Ao **Prof. Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos**, pela receptividade, exemplo e dedicação ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal.

Aos meus queridos **Maria Fernanda Vianna Marvulo** e **Jean Carlos Ramos Silva**, por esses mais de dez anos de amizade, pelo incentivo e ajuda para iniciar o mestrado.

À pesquisadora **Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro** pela amizade e apoio.

A todos os **Professores, Funcionários e Pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal**, pela convivência harmoniosa.

Ao **Departamento de Clínica Médica (VCM) e de Patologia (VPT)**, pelas amostras.

À **Cristina, Virgínia e Danival**, da Secretaria do VPS, pela amizade e colaboração.

À **Comissão de Bioética e Roseli da Costa Gomes**, Secretaria da Comissão, pela ajuda e compreensão.

À **Claudia Lima, Tânia Delonero, Daura, Carlos e Joana**, da Secretaria da Pós-Graduação, por todo auxílio.

À **Elza Faquim**, da Biblioteca, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pela atenção e colaboração para finalizar a dissertação.

Ao **CAPES** pela bolsa de estudo e a **FAPESP** pelo auxílio à pesquisa (processo n°2008/58051-1).

A Deus, pelo fortalecimento contínuo e por iluminar **SEMPRE** o caminho.

“... o saber não está na ciência alheia, que se absorve, mas, principalmente, nas idéias próprias que se geram dos conhecimentos absorvidos, mediante a transmutação, por que passam, no espírito que os assimila. Um sabedor não é um armário de sabedoria armazenada, mas transformador reflexivo de aquisições digeridas...”

Rui Barbosa.

RESUMO

BRUGNANO, F. M. L. Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos. [Identification of animal species for meat samples through the polymerase chain reaction: the food fraud control method.]. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O presente estudo teve por objetivos padronizar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a identificação da espécie bovina, suína e canina em amostras de carne utilizando diferentes concentrações (0% 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%); analisar as amostras provenientes de vistorias realizadas pela Coordenação de Vigilância à Saúde (COVISA) do Município de São Paulo e, aferir os custos do método para oferecer como atividade de extensão, as análises laboratoriais. Na padronização o limite mínimo de detecção foi de 0,1% para material bovino, 0,01% para suíno e 10% para cão. É necessário aprimorar a técnica na identificação de cães e testar outros primers, além de padronizar outras espécies. Cinquenta e três amostras foram encaminhadas pela COVISA, sendo analisadas e obtendo os seguintes resultados: 60% bovina, 19% suína, 13% espécie não foi identificada (falta do primer específico) e em 8% ocorreu algum tipo de contaminação da amostra, provavelmente no estabelecimento vistoriado (contaminação cruzada). O custo final da reação para três espécies foi de R\$ 100,47 sendo R\$ 55,27 (55,01%) correspondente aos reagentes e R\$ 45,20 (44,99%) referente a mão de obra. O tempo médio para obtenção dos resultados foi de 9h03'23", estimado sem qualquer contaminação ou repetição de etapa.

Palavras-chave: Inspeção dos produtos de origem animal. Saúde pública. PCR. Vigilância Sanitária de Alimentos. Fraude em alimentos.

ABSTRACT

BRUGNANO, F. M. L. **Identification of animal species for meat samples through the polymerase chain reaction:** the food fraud control method. [Identificação da espécie animal em amostras de carne através da reação em cadeia pela polimerase: o método de controle de fraudes em alimentos]. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The present study aimed at standardizing the reaction polymerase chain (PCR) for the identification of bovine, porcine and canine meat samples using different concentrations (0% 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%); at analyzing samples originated from inspections made by the Health Surveillance Coordination (COVISA) of São Paulo, and at evaluating method costs in order to offer laboratorial analyses as an extension activity. In the standardization, the minimum detection limit was of 0.1% for bovine, 0.01% for porcine and 10% for canine material. It is necessary to improve the identification technique in dogs and to test other primers, in addition to standardizing other species. Fifty-three samples were sent by COVISA, and after analysis the following results were obtained: 60% were from bovines, 19% from porcines and 13% from non-identified species (lack of specific primer) in addition to some sort of contamination, probably from the inspected establishment, occurred in 8% of the samples (cross contamination). The final cost of the reaction for the three species was R\$ 100.47, out of which R\$ 55.27 (55.01%) corresponded to reagents and R\$ 45.20 (44.99%) to work labor. The average time for obtaining results was 9h03'23", estimated without the occurrence of any contamination or repetition of the step.

Keywords: Inspection of products of animal origin. Health. PCR. Surveillance of Food. Fraud in food.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Membro posterior bovino.....	44
Figura 2 –	Músculos superficiais do membro pélvico de bovino: vista lateral.....	45
Figura 3 –	Músculos superficiais do membro pélvico de suíno: vista lateral	45
Figura 4 –	Músculos superficiais do membro pélvico de cão: vista lateral...	46
Figura 5 –	Amostras da COVISA lacradas.....	47
Figura 6 –	Termo de coleta da amostra (TCA) da COVISA.....	48
Figura 7 –	Modelo conceitual de variáveis.....	52
Figura 8 –	Gel de agarose: especificidade de suíno.....	60
Figura 9 –	Perfil das bandas no gel de agarose (bovino e suíno).....	61
Figura 10 –	Perfil das bandas no gel de agarose (canino).....	62
Figura 11 –	Perfil das bandas no gel de agarose (bandas inespecíficas)....	79
Figura 12 –	Tripas.....	102
Figura 13 –	Carnes defumadas.....	102
Figura 14 –	Carnes “tipo carpaccio”.....	102
Figura 15 –	Lingüiça de fabricação caseira.....	103

Figura 16 –	Carne com gordura, casco, crua, refrigerada.....	103
Figura 17 –	Presença de várias apresentações.....	103
Figura 18 –	Carne previamente moída.....	103
Figura 19 –	Carnes com osso, cruas, refrigeradas e sem tempero.....	103
Figura 20 –	Carnes com osso, gordura, cartilagem, cruas e refrigeradas.....	103
Figura 21 –	Carnes desconhecidas macroscopicamente.....	104
Figura 22 –	Falha na higienização.....	107
Figura 23 –	Utensílios com sinais de ferrugem e sujidades.....	108
Figura 24 –	Presença de produtos impróprios na área de manipulação.....	108
Figura 25 –	Presença de alimentos no chão (câmara fria e área de manipulação).....	108
Figura 26 –	Alimentos abertos dentro do refrigerador e sem qualquer identificação.....	109
Figura 27 –	Área de manipulação inadequada (ambiente aberto e com presença de bicicleta pendurada).....	109
Figura 28 –	Prateleira inadequada e presença de produto de limpeza (área de manipulação).....	110
Figura 29 –	Restos alimentares do dia anterior e presença de praga.....	110
Figura 30 –	Riscos ao trabalhador.....	111

LISTA DE GRÁFICOS E FLUXOGRAMA

Gráfico 1 –	Amostras encaminhadas pela COVISA, segundo a espécie, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.	63
Gráfico 2 –	Resultado das amostras encaminhadas pela COVISA, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	66
Fluxograma 1 –	Atividades envolvidas na realização das análises laboratoriais para identificação da espécie por PCR. São Paulo, 2009.....	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Classificação segundo as culturas (comestível / não comestível) de certas espécies animais.....	27
Quadro 2 –	Resultado do PCR das amostras encaminhadas pela COVISA provenientes de restaurantes vistoriados em São Paulo, por ordem numérica de lacre, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	65
Quadro 3 –	Custo unitário de reagentes utilizados para identificação da espécie na PCR, valores aferidos de maio a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	67
Quadro 4 –	Custos das soluções preparadas no LABMAS para PCR, no período de maio a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	69
Quadro 5 –	Reagentes utilizados na PCR para identificação da espécie, com amostra única, no Laboratório de Higiene Alimentar e LABMAS - São Paulo - 2009.....	71
Quadro 6 –	Reagentes utilizados para PCR, com uma amostra e dois controles (positivo e negativo), no Laboratório de Higiene Alimentar e LABMAS - São Paulo - 2009.....	73
Quadro 7 –	Reagentes utilizados para PCR, com uma amostra e dois controles (positivo e negativo) e triplicata a partir do mix - São Paulo - 2009.....	74
Quadro 8 –	Reagentes utilizados para PCR, com dez amostras e três controles (um positivo e dois negativos) - São Paulo - 2009.....	81

Quadro 9 –	Plano de classificação de funções do grupo técnico da Universidade de São Paulo, aprovado pelo CCRH em 08.06.2009 - São Paulo - 2009.....	105
Quadro 10 –	Vencimento de funcionários da Universidade de São Paulo, atualizada em 22 de junho de 2009 - São Paulo - 2009.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais características macroscópicas das amostras coletadas nas vistorias realizadas pela COVISA, durante o período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	64
Tabela 2 –	Determinação do tempo para a realização de PCR de uma amostra e dois controles (positivo e negativo) nos Laboratórios de Higiene Alimentar e LABMAS, com triplicata a partir do mix, no período de julho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009.....	75
Tabela 3 –	Especificações de reagentes utilizados na PCR para identificação da espécie - São Paulo - 2009.....	98

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
°C	graus Celsius
'	minuto de hora
µL	microlitros
µg	microgramas
"	segundos de minuto
®	marca registrada
R\$	Reais
U\$	Dólar
+	adição
h	hora
V	Volts
\tilde{x}	média
C+	controle positivo
C-	controle negativo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSE	encefalopatia espongiforme bovina
CCRH	Comissão Central de Recursos Humanos
cd	cada
cm	centímetro
COVISA	Coordenação de Vigilância em Saúde
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
cx	caixa
DECAP	Departamento de Policia Judiciária da Capital
DEPC	dietilpirocarbonato
DIPAC	Divisão de Padronização e Classificação de Produtos de Origem Animal
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPCC	Departamento de Polícia de Proteção à Cidadania
et al.	colaboradores
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPI	equipamento de proteção individual
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
fr	frasco
g	gramas
GT	Isotiocianato de guanidina
kg	Quilo
LABMAS	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
L	litro

M	molar
mg	milígrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mix	mistura
mL	militro
mM	milimolar
Na ₂ EDTA	EDTA sal dissódico
NaOH	hidróxido de sódio
n/mol	nanomol
PA	Estado do Pará
p.a	pronto para o uso
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
PCR-RFLP	restriction fragment length polymorphism
pcte	pacote
pH	concentração de hidrogênio iônico
primers	oligonucleotídeos
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RNA	ácido ribonucléico
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SP	São Paulo
TBE	tris borato EDTA
TCA	termo de coleta da amostra

TE TRIS EDTA	tampão TRIS EDTA
TRIS	hidroximetil aminometano
Tris HCl	hidroximetil aminometano com ácido clorídrico
U	unidades
USP	Universidade de São Paulo
UV	ultravioleta
X g	vezes aceleração da gravidade terrestre ($9,8 \text{ m/s}^2$)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 PERIGOS RELEVANTES PARA A SAÚDE PÚBLICA.....	30
2.2 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE AUTENTICIDADE DE PRODUTOS CÁRNEOS.....	33
2.3 CONTABILIDADE DOS CUSTOS LABORATORIAIS E MENSURAÇÃO DO TEMPO.....	36
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
5. MATERIAIS E MÉTODO.....	43
5.1 AMOSTRAGEM.....	43
5.1.1 Padronização da técnica.....	43
5.1.2 Análise das amostras obtidas da COVISA.....	47
5.2 EXTRAÇÃO DO DNA.....	49
5.3 AMPLIFICAÇÃO.....	50
5.4 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	51
5.5 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS E TEMPO.....	52

6. RESULTADOS	60
6.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA.....	60
6.1. 1 Limiar mínimo de detecção.....	61
6.2 AMOSTRAS DA COVISA.....	62
6.3 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS E TEMPO.....	67
7. DISCUSSÃO.....	77
8. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICES	96
ANEXOS.....	100

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O potencial de emprego da reação em cadeia pela polimerase (PCR), com a finalidade de detectar a espécie de origem na matéria-prima em produtos cárneos, começou a ser percebido alguns anos após esta metodologia ser empregada na área médica e na pesquisa biológica básica.

Alguns métodos analíticos foram desenvolvidos com o objetivo de identificar adulterações em produtos de origem animal, porém o desempenho destas técnicas é limitado, ao se analisar proteínas que sofrem alterações por processos tecnológicos.

A substituição de uma matéria prima animal por outra espécie implica em fraude, gerando falsidade ideológica, desigualdade competitiva, prejuízos econômicos ao setor e riscos para a saúde pública.

A identificação e o combate a fraudes em alimentos dependem de recursos eficientes, fundamentados por conhecimento científico e disponibilidade tecnológica.

Dentre as atividades dos serviços oficiais de fiscalização da produção e comercialização dos produtos de origem animal está, além da salvaguarda da saúde pública e saúde animal, a identificação e controle de fraudes e adulterações de produtos.

A necessidade atual das autoridades sanitárias e dos órgãos oficiais de inspeção motivou o presente trabalho, pois, desde o ano de 2006, há suspeitas de comercialização de carnes provenientes de espécies não regulamentadas para o abate, mais especificamente de carne de cão.

Este trabalho teve por objetivo padronizar a PCR para a identificação das espécies bovina, suína e canina, em amostras de carne sob diferentes concentrações, com a finalidade de possibilitar um recurso diagnóstico viável aos serviços oficiais de inspeção e vigilância sanitária de alimentos e aferir os custos do método, para oferecer como atividade de extensão às análises laboratoriais.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

O desenvolvimento da biotecnologia trouxe avanços científicos em diferentes segmentos do conhecimento, oferecendo recursos de alta sensibilidade e especificidade. Em relação à agroindústria da carne e seus derivados, a técnica da amplificação do ácido desoxirribonucléico (DNA) pela reação em cadeia de polimerase (PCR) é um recurso viável para análises de rotina da avaliação da autenticidade de produtos, cuja importância ultrapassa os limites de aspectos relacionados à fraude, abarcando em valores de natureza social, ética e de saúde pública.

Segundo Maciel (2001), a escolha do que será considerado "alimento" e de como, quando e por que será consumido, está relacionada com uma classificação estabelecida culturalmente. Em muitos países, carne de cachorro, não é considerada "comestível", porém, em alguns, é uma iguaria. Na Índia, por crença religiosa, a ingestão de carne de vaca é um tabu, mesmo que os rebanhos sejam abundantes; já em países islâmicos, a carne suína é considerada "impura". Assim, o que é "alimento" em uma cultura, não é em outra, fato derivado não de seu valor nutritivo ou risco à saúde.

Além da definição do que é alimento, há também a escolha da apresentação deste (cru, cozido, assado, vivo, apodrecido) e da técnica utilizada para preservação (salgado, defumado, congelado). Estes aspectos constituem sistemas alimentares que estão ligados a representações coletivas e crenças. O tipo de alimento pode marcar um território, nação ou região (podemos assim falar em "cozinhas" de um ponto de vista "territorial", tal como a "cozinha chinesa", a "cozinha baiana", ou a "cozinha mediterrânea") (MACIEL, 2001).

De acordo com Strobel et al. (2005), inicialmente com a imigração e atualmente com o livre mercado, a culinária brasileira passou a ser composta por várias culturas, devido à introdução de particularidades gastronômicas, bem como seu respectivo preparo e consumo; fato também propiciado pela globalização.

Quadro 1 - Classificação segundo as culturas (comestível / não comestível) de certas espécies animais

ANIMAL	COMESTÍVEL	NÃO COMESTÍVEL
Insetos	América Latina, Ásia, África	Parte da Europa e América do Norte
Cão	Coréia, China e Oceania	Europa, América do Norte, América do Sul
Cavalo	França, Bélgica, Japão	Grã-Bretanha, América do Norte
Coelho	França, Itália	Grã-Bretanha, América do Norte
Rã	França, Ásia	Europa, América do Norte

Fonte: Fischler (2001).

Pelo quadro 1, podemos verificar as diferenças culturais na aceitação de ingestão de carne. No Brasil, a carne de cachorro não é aceita, apesar de ser comestível na Coréia, China e Oceania. Em nosso país, o cão é tratado quase como membro da família e não há legislação específica para seu abate (com a finalidade de consumo), muito menos Inspeção Federal.

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Decreto-Lei 30691/52, Art.106: nos estabelecimentos subordinados à Inspeção Federal é permitida a matança de bovinos, eqüinos, suínos, ovinos, caprinos e coelhos, bem como das diferentes aves domésticas e de caça (procedentes de criadouro), usadas na alimentação humana (BRASIL, 1952).

Portanto, a carne de cachorro implica no consumo de produto clandestino, conduta que tem reflexos em diversas áreas: saúde (na medida em que coloca em risco a população, podendo provocar doenças), meio ambiente (pode acarretar poluição ambiental, como dispensa de materiais em manancial) e consumidor (por violar direitos básicos da relação de consumo).

Tais atos podem ser considerados crime, sendo previstos na legislação brasileira:

❖ Código Penal Brasileiro, Decreto-Lei N° 2.848/40, Capítulo III - dos Crimes Contra Saúde Pública, Infração de medida sanitária preventiva:

Art. 268 - infringir determinação do poder público, destinada a impedir introdução ou propagação de doença contagiosa;

Art. 278 - fabricar, vender, expor à venda, ter em depósito para vender ou, de qualquer forma, entregar a consumo coisa ou substância nociva à saúde, ainda que não destinada à alimentação ou a fim medicinal (BRASIL, 1940).

- ❖ Lei N° 8.137/90, Capítulo II – dos Crimes Contra Economia e as Relações de Consumo:

Art. VII, parágrafo II - vender ou expor à venda mercadoria cuja embalagem, tipo, especificação, peso ou composição esteja em desacordo com as prescrições legais, ou que não corresponda à respectiva classificação oficial (BRASIL, 1990a).

- ❖ Código de Defesa do Consumidor, Lei ° 8.078/90, Capítulo IV – da Qualidade de Produtos e Serviços, da Prevenção e Reparação dos Danos, Seção I, da proteção à Saúde e Segurança:

Art. 8 - os produtos e serviços colocados no mercado de consumo não acarretarão riscos à saúde ou segurança dos consumidores, exceto os considerados normais e previsíveis em decorrência de sua natureza e fruição, obrigando-se os fornecedores, em qualquer hipótese, a dar as informações necessárias e adequadas a seu respeito;

Art. 18 § 6º - São impróprios ao uso e consumo: II - os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivos à vida ou à saúde, perigosos ou, ainda, aqueles em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição ou apresentação;

Art. 39 - é vedado ao fornecedor de produtos ou serviços, dentre outras práticas abusivas: VIII - colocar, no mercado de consumo, qualquer produto ou serviço em desacordo com as normas expedidas pelos órgãos oficiais competentes (BRASIL, 1990b).

- ❖ Lei Contra Crimes Ambientais, Lei N° 9.605/98 - Capítulo V – dos Crimes Contra o Meio Ambiente. Seção I – dos Crimes Contra a Fauna:

Art. 32. Praticar ato de abuso, maus-tratos, ferir ou mutilar animais silvestres, domésticos ou domesticados, nativos ou exóticos.

Ainda nessa legislação, há a definição quando o abate não é considerado crime no Art. 37 - não é crime o abate de animal, quando realizado: I em estado de necessidade, para saciar a fome do agente ou de sua família; II - para proteger

lavouras, pomares e rebanhos da ação predatória ou destruidora de animais, desde que legal e expressamente autorizado pela autoridade competente; IV - por ser nocivo o animal, desde que assim caracterizado pelo órgão competente (BRASIL, 1998).

Além da ausência de fiscalização ou obedecimento a normas estabelecidas pelos órgãos oficiais competentes, em locais de abate clandestino há o predomínio de péssimas condições de higiene, cujas operações são realizadas num total desacordo com procedimentos tecnológicos; manejo de animais em condições de crueldade, deficiência de equipamentos, falta de controle de temperatura do produto (durante todo o processo), bem como detecção sorológica de patógenos e até falha no uso de equipamentos de proteção individual, colocando em risco tanto a saúde do consumidor, quanto a do manipulador (FREITAS et al., 2006).

Em 2005, Abrahão relata que mesmo a carne obtida de animais sadios é um veículo potencial de contaminantes de natureza biológica, física e química, nas diversas fases de processamento, que vão desde a produção, transformação, armazenamento, transporte e condições de comercialização. A carne pode ser contaminada desde a sangria, abate do animal e até no varejo; portanto, os processos demandam uma série de cuidados e, de acordo com o Art. 11 do RIISPOA, todos os estabelecimentos de carnes e derivados que abatam e industrializem as diferentes espécies de açougue e de caça, necessitam ter uma inspeção federal permanente (BRASIL, 1952).

Segundo Azevedo (2001), no Brasil, assim como em diversos países, o mercado informal (clandestino) caminha paralelamente ao mercado formal, comercializando produtos e competindo em busca do consumidor. O mercado clandestino oferece carne com preço aproximadamente 30% inferior devido à sonegação fiscal, comparado com os abates legais.

A situação é mais grave, se levarmos em consideração uma pesquisa realizada por Buso (2000), a qual relata que o consumidor tem uma grande confiança (75%) em relação à segurança do alimento. Esta confiabilidade, por sua vez, não decorre muitas vezes das certificações sanitárias, mas em especial, da relação entre consumidor e o ponto de venda ou de consumo.

Silva (2000) relata a ocorrência da adição de carne de baixo valor comercial ou de espécies diferentes daquela declarada no rótulo de produtos cárneos em

diversas partes do mundo, citando Estados Unidos, Inglaterra, Austrália e Espanha. Veloso, desde 2002, afirma que a autenticidade dos alimentos tornou-se um problema mundial e cada vez mais exigida no mercado globalizado.

A indústria e os serviços oficiais de fiscalização da produção e comercialização de produtos de origem animal necessitam ter à sua disposição, meios que possam dar respostas precisas. A reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem demonstrado viabilidade para a identificação da espécie, além de ter baixas taxas de falso-positivo e falso-negativo (MEYER et al., 2001).

2.1 PERIGOS RELEVANTES PARA A SAÚDE PÚBLICA

Importantes doenças ou zoonoses podem ser adquiridas a partir do consumo de carnes. Dentre elas, podem ser citadas:

- Encefalopatia espongiforme bovina (BSE): identificada na Inglaterra em 1986, vulgarmente conhecida como “Doença da Vaca Louca”. Afeta o gado doméstico e apresenta como sintomatologia: alterações comportamentais, tremores, contração muscular e paresia de membros. Doença causada por uma forma especial de proteína (chamada prón). O animal pode adquirir BSE pelo consumo de ração com farinha de carne. É transmissível ao homem através da ingestão de carne proveniente de animal contaminado (ANDERSON et al., 1996).
- Triquenelose: parasita intestinal do homem ou de outros animais (caninos, felinos, roedores e suínos). Infecção ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida, com cistos. Doença cosmopolita, sendo mais freqüente em países da Ásia, África e América Latina; apresenta como sintomatologia irritabilidade, insônia e dores abdominais. Não há relatos no Brasil, mas há casos humanos devido à ingestão de carne de cão na China (WANG et al., 2001).
- Brucelose: segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), em humanos é caracterizada por febre, debilidade, cefaléia e perda de peso

(CVE, [2002]a). Doença zoonótica transmitida por alimento, tem como fatores de risco, além da ingestão de alimentos contaminados, o contato com animais e o exercício de atividades que envolvem o contato com eles. Em estudo realizado em Belém – PA, suínos procedentes de abate clandestino apresentaram títulos de anticorpos para brucelose (FREITAS et al., 2001). De acordo com Carvalho et al. (1995), casos de brucelose devido ao consumo de carne são raros e difíceis, pois limitam-se a um pequeno número de bactérias por grama de músculo.

- Toxoplasmose: protozoonose que apresenta manifestações graves, desde esplenomegalia, icterícia, convulsões, surdez, uveíte e retinocoroidite. O homem pode contrair a infecção pela ingestão de cistos presentes em carnes insuficientemente cozidas (mal passadas), principalmente carne suína (GERMANO; GERMANO, 2003). De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE, [2002]b), a transmissão também pode ocorrer pela ingestão de oocistos provenientes de mãos contaminadas por fezes, alimentos ou água. Embora o consumo de carne seja comum em algumas culturas, o cão aparentemente só é veiculador de oocistos através do pelo (ALVES, 2007).
- Complexo Teníase-Cisticercose: grande problema de saúde pública, pois provoca teníase no homem, pela ingestão de alimento ou água contaminada com ovos de *Taenia* e a cisticercose pela ingestão de carne crua ou insuficientemente cozida, que contenha cisticercos viáveis. Em estudo de Ungar (1992) sobre cisticercose bovina no Estado de São Paulo, a partir do Serviço de Inspeção Federal (SIF), foi encontrada uma prevalência de 5,5% da doença.
- Raiva: vírus da família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus*, transmitido através da mordedura, arranhadura ou lambadura de pele ferida; há relatos de transmissão por aerossóis, transplante de córnea e órgãos. O cão e o morcego hematófago continuam sendo os principais reservatórios (CARRIERI et al., 2006). O hábito de ingestão de carne de cachorro é comum no Sul da China, onde ocorre uma epidemia de raiva; muitas famílias vendem cães não

vacinados e sem dieta especial para os restaurantes com a finalidade de aumentar a renda (média de 12 a 15 dólares por cão). Segundo Tao et al. (2009), cães comprados são abatidos rapidamente, não ocorrendo tempo para transmissão do vírus e, até o momento, não há relatos de raiva humana pelo consumo dessa carne na China.

- Tuberculose: ocorrência tem sido atribuída à ingestão de leite não pasteurizado ou ingestão de carne crua. De acordo com Abrahão et al. (2005), no Brasil o risco de contrair tuberculose é menor, devido à baixa incidência do agente em tecidos musculares; além disso não temos o hábito de ingestão de carne crua, porém o problema não pode ser ignorado.
- Salmonelose: bactéria transmitida por alimentos contaminados (ovos, carnes e seus derivados), responsável por síndromes febris e enterocolite. Segundo Maciel et al. (2004), os cães representam um importante reservatório de sorotipos exóticos de *Salmonella* sp.
- Outros agentes bacterianos de importância como: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* (GERMANO; GERMANO, 2003).

O risco de transmissão de agentes patogênicos não se dá somente pelo consumo de carne de animais com procedência duvidosa; indivíduos que participam das operações de abate (corte e recorte dos animais), também se expõem através do contato direto com tecidos, sangue e vísceras. Em levantamento sorológico de trabalhadores de frigoríficos no Estado do Paraná, realizado por Gonçalves et al. (2006), foi encontrada taxa de positividade para leptospirose de 4%, para brucelose de 0,66% e para toxoplasmose de 70%.

Deve-se considerar ainda, que existem vários outros perigos, além dos citados acima. Frente a esta situação, é necessário investir, ampliar conhecimento e aprimorar técnicas capazes de dar suporte aos órgãos oficiais de inspeção e vigilância sanitária para que, de fato, cumpram seu papel na sociedade.

2.2 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE AUTENTICIDADE DE PRODUTOS CÁRNEOS

São conhecidas algumas técnicas, para determinação da autenticidade de produtos cárneos, pela identificação das espécies animais nas matérias-primas. Por exemplo: cromatografia gasosa (TOOROP et al., 1997), técnicas imunológicas (GIOVANNACCI et al., 2004) e a eletroforese capilar (VALLEJO et al., 2005). Apesar de serem técnicas úteis em várias situações, podem não ser totalmente convenientes em análises de rotina, em virtude do relativo custo, pelo tempo necessário, complexidade de execução e limitação destas técnicas ao se analisar proteínas, muitas das quais sofrem alterações em processos tecnológicos (CHEN; HSIEH, 2000).

A identificação da espécie em produtos cárneos intensamente processados pelo calor é dificultada pela desnaturação progressiva da proteína e, também, a salga e a dessecção podem interferir na maioria dos métodos biológicos ou bioquímicos (PARDI et al., 2004).

Outro fator inconveniente destas técnicas é o nível mínimo de detecção. Segundo Meyer et al. (1994), testes imunológicos não foram capazes de detectar níveis baixos de carne de porco na amostra (inferior a 20% na carne cozida e menores de 10% na carne fresca).

Segundo Losio et al. (2004), métodos eletroforéticos e imunológicos não podem distinguir espécies estreitamente relacionadas entre si e não são adequados para produtos alimentares com matrizes complexas.

Métodos baseados na análise do DNA são bastante atrativos. Meyer e Candrian, em 1996, afirmaram que a PCR é viável para análise em alimentos por ser simples e específica; reconhecem-na como ferramenta segura na identificação de espécies em produtos alimentares, oferecendo informações mais precisas em relação à pesquisa de proteínas, devido à maior resistência do DNA aos processos térmicos e por estar presente em qualquer tecido e célula.

Alguns pesquisadores já trabalharam com o DNA em estudos paleontológicos (ossos de fósseis ou de restos estruturais); na medicina humana forense (estudando o DNA da saliva, cabelo, sangue presentes em cenas de crime); na identificação de microrganismos invasores e, mais recentemente, na autenticação de alimentos

(TELETCHEA et al., 2005).

Na área de alimentos, houve maior número de trabalhos científicos sobre PCR para detecção da espécie animal a partir da BSE. Porém a grande maioria deles visou a detecção de matéria animal usada para a fabricação de ração (DALMASSO et al., 2004; TOYODA et al., 2004; SHINODA et al., 2008; CAWTHRAW et al., 2009; YOSHIDA et al., 2009; ZENG et al., 2009;). A fraude em alimentos ou derivados apresenta ainda número reduzido de trabalhos científicos.

Um dos trabalhos descrevendo a PCR para amplificação de DNA mitocondrial específico de bovino em produtos derivados de carne bovina foi publicado por Tartaglia et al. (1998). O método descrito permitiu a detecção de material bovino em carne, numa taxa de inclusão de 0,125%.

Citando alguns autores, na Holanda, Janssen et al. (1998) detectaram em 20 amostras de hambúrguer: carne suína, eqüina e de frango, em substituição ou em adição à carne bovina. Em outras amostras de carne para exportação com destino a países islâmicos, foi encontrada carne suína em produtos bovinos.

Calvo et al. (2001) conseguiu detectar 0,005% de carne de porco em conservas, produtos curados e patês. Em 2002, Calvo, Osta e Zaragoza, detectaram 0,01% de carne bovina, aquecidas ou não, em produtos derivados de carne, como embutidos, conservas e hambúrgers; nesse mesmo ano (2002) Calvo et al., detectaram fraude através da adição de carne de porco em patê de pato comercial, quantificando o grau de contaminação em 1%.

De acordo com Calvo, Osta e Zaragoza (2002), a PCR é um recurso adequado para a identificação espécie específica de DNA em carne, osso e em misturas destes, havendo boa especificidade no teste.

Rodriguez et al. (2003) utilizaram seqüências conservadas de DNA do gene 12S do RNA ribossomal e diferenciaram com precisão, pela técnica da PCR: ganso, pato, galinha, peru e suíno, em amostras de *foie-gras*. Encontraram o limite mínimo de detecção de 1% para cada espécie e o processamento térmico não interferiu negativamente.

No ano seguinte, Rodriguez et al. (2004), também utilizando sequência de DNA no gene 12S do RNA ribossomal, identificou um limite de detecção de 1% de carne de porco, carne bovina, ovina e caprina em misturas à base de carne.

O método da PCR também foi utilizado por Gao et al. em 2004, para detecção de materiais caninos em alimentos para animais utilizando DNA mitocondrial, obtendo resultado para confirmação da presença de material de cão em uma concentração reduzida (0,05%).

López-Andreou et al. (2005) utilizou PCR em tempo real em alimentos processados comerciais detectando 1% de carne de porco, frango e peru e de 5% para carne bovina e de cordeiro.

Tanabe et al. em 2007, desenvolveu PCR em tempo real para detectar carne de porco, frango, bovina, carneiro e de cavalo, em alimentos processados.

Em trabalho realizado na Espanha, as carnes de camurça (espécie de capríneo da Europa), cabra das montanhas rochosas e carneiro da montanha foram submetidas à identificação por PCR após pasteurização experimental de 72°C por 30' e esterilização a 121°C por 20', sendo o limite de detecção para cada espécie alvo de 0,1% (FAJARDO et al., 2007).

Ainda em 2007, Girish et al., utilizaram à técnica Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) para identificar e diferenciar carnes de aves, como: frango, pato, codornas, galinha d'angola e peru.

Em estudo de Caldwell et al. (2007), foi analisada a contaminação fecal em efluentes, utilizando PCR em gene mitocondrial, tendo como base a seqüência de nucleotídeos específicos para a espécie bovina e suína. Neste estudo, foi encontrada uma eficiência respectivamente de 95% e 100% do método. Em relação à especificidade, obteve-se 100% de identidade para a espécie de origem. Não foi relatado nenhum falso positivo ou reação cruzada com outra espécie similar.

A substituição de uma espécie animal por outra implica em desvios por falsidade ideológica, infração da legislação, prejuízos econômicos para o Estado e desigualdade competitiva entre produtores e comerciantes. Além do que, na fraude, utilizam-se de “alternativas” de baixo valor nutricional e qualidade questionável, colocando em risco a saúde pública. Acredita-se que a identificação e controle de tais práticas, irão depender do desenvolvimento de recursos eficientes.

2.3 CONTABILIDADE DOS CUSTOS LABORATORIAIS E MENSURAÇÃO DO TEMPO

Para oferecer o método da PCR como recurso diagnóstico aos Serviços Oficiais de fiscalização, faz-se necessária uma análise de custo.

A contabilidade de custos no laboratório de análises auxilia na gestão e no planejamento dos recursos, garantindo equilíbrio financeiro para sua manutenção.

De acordo com Lima (2007), os propósitos de um sistema de custo são:

- identificar e controlar os custos de suas operações,
- dar base para fixação de preços,
- auxiliar na tomada de decisão sobre alternativas de investimento de capital e de métodos,
- favorecer a melhoria contínua de tecnologia e de métodos.

Para obtenção dos custos, a literatura especializada em contabilidade refere alguns métodos de custeio; o utilizado para esse trabalho, é chamado custeio direto ou variável, que é fundamentado na separação dos custos fixos e variáveis. No cálculo dos custos finais são computados somente os custos variáveis, os fixos são considerados como despesas (FREITAS, 2005).

Os custos também podem ser classificados quanto à apuração (SANNAZZARRO, 1998):

- custos diretos (mão-de-obra, material, depreciação de equipamentos),
- custos indiretos (rateio, energia elétrica, água, telefone, material de escritório / limpeza, aluguel, transporte, alimentação, administração e segurança patrimonial).

Deve-se salientar que o processo de avaliação de custos numa determinada instituição não deve ser um processo meramente estatístico, mas constantemente avaliado, pois os valores podem ser afetados por política cambial (importados), substituição de fornecedores e por diversos motivos, característicos de uma economia globalizada (GERTH, 2001).

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A cidade de São Paulo é considerada um centro gastronômico, com opções desde a cozinha regional até a mais requintada e exótica tendência internacional, apresentando uma diversidade de pratos e iguarias. Portanto, é fundamental identificar as espécies animais comercializadas ou utilizadas na preparação de alimentos tanto para combater fraudes, como para eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde da população.

“Em março de 2006, a Vigilância Sanitária de Alimentos do Município de São Paulo, recebeu um ofício do Departamento de Polícia Judiciária da Capital (DECAP), da Secretaria da Segurança Pública, solicitando vistoria sanitária em um estabelecimento, onde os responsáveis estariam cometendo atos de abuso e ou maus tratos, conforme Art. 32 da Lei Federal nº 9.605/98 (BRASIL, 1998), por “sacrificar” cães para comercialização da carne.

Segundo o Art. 135 do RIISPOA, só é permitido o sacrifício de animais por métodos humanitários, utilizando-se de prévia insensibilização baseada em princípios científicos, seguida de imediata sangria e somente de espécies descritas no Art. 106, já citado anteriormente (BRASIL, 1952).

No ato de vistoria da equipe técnica da Coordenadoria de Vigilância em Saúde (COVISA), Subgerência de Vigilância de Alimentos, foram constatadas inúmeras irregularidades tais como: falta de licença da Prefeitura (para funcionamento e exercício da atividade), ausência de atestados de saúde dos manipuladores, presença de animais vivos (peixes, crustáceos e anfíbios), falta de uso do uniforme, falha na higiene de equipamentos e utensílios, além da manipulação incorreta de alimentos.

Amostras de carne crua e cozida com aspecto e coloração estranha foram coletadas, respectivamente três de cada, totalizando seis amostras para a identificação da espécie de origem, uma vez que a denúncia relatava o uso de carne de cão. O Instituto Adolfo Lutz, da Secretaria de Estado da Saúde, realizou análise das amostras pelo método de imunoelétroforese com restrições, pois a técnica disponível necessitava de anti-soro espécie-específico e que todas as amostras estivessem cruas (sem desnaturação de proteínas).

Em relação aos resultados, duas amostras de carne crua foram reagentes para proteína suína, uma amostra não reagiu para proteína suína, não tendo sido realizada outra análise por falta de anti-soro de outras espécies (inclusive a canina) e as demais amostras não foram analisadas por apresentarem-se cozidas. Os resultados não reagentes continuaram como “indeterminados”.

Desde o ano de 2006, durante as fiscalizações de estabelecimentos de Cozinha Oriental, principalmente Chinesa e Coreana, foram observadas carnes com coloração que diferem do aspecto de carne bovina ou suína.

Em 12 de novembro de 2009, a 2^a Delegacia de Saúde Pública do Departamento de Polícia de Proteção à Cidadania (DPCC) prendeu um casal suspeito de manter abatedouro de cães e vender a carne para restaurantes coreanos da cidade de São Paulo (Anexo F).

A suspeita continua recorrente, porém a Vigilância Sanitária de Alimentos não dispõe, no âmbito do Estado de São Paulo, recursos aplicáveis e viáveis economicamente para o esclarecimento dessas situações e tomada de decisões” (informação verbal)¹.

É urgente a necessidade de se desenvolver metodologia precisa, segura, eficiente e aplicável para produtos crus, cozidos, congelados, processados, adicionados de outros ingredientes ou defumados.

Considerando todas as disposições acima, o presente trabalho, objetiva padronizar a PCR para as espécies bovina, suína e canina, levantar os custos do método e aplicá-lo em amostras de alimentos provenientes de vistorias realizadas pelo Serviço de Vigilância Sanitária de Alimentos do Município de São Paulo.

¹ Informação fornecida pela Médica Veterinária Andrea Barbosa Boanova – COVISA - Vigilância Sanitária de Alimentos - Secretaria Municipal de Saúde – Prefeitura de São Paulo em fev. 2008.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O projeto teve como objetivo padronizar a reação em cadeia pela polimerase para a identificação da espécie bovina, suína e canina em amostras de carne em diferentes concentrações, visando oferecer um recurso diagnóstico para os Serviços de Vigilância Sanitária de Alimentos no combate às fraudes, mais especificamente carne e derivados, além de aferir os custos do método para oferecer como atividade de extensão às análises laboratoriais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Padronização a PCR para a identificação de carne bovina, suína e canina em diferentes concentrações: 0%; 0,001%; 0,01%, 0,1%; 1%; 10%; 25%; 50%, 75% e 100%.
- ✓ Aplicação da PCR em alimentos suspeitos provenientes de vistorias realizadas pela COVISA, Subgerência de Vigilância de Alimentos, no Município de São Paulo, em estabelecimentos comerciais, durante o período de 01 de junho de 2009 a 15 de novembro de 2009.
- ✓ Levantamento dos custos diretos (reagentes e mão de obra) e tempo para realização pelo técnico laboratorial de nível médio.

MATERIAIS E MÉTODO

5 MATERIAIS E MÉTODO

Os materiais e método estão descritos a seguir.

5.1 AMOSTRAGEM

5.1. Padronização da técnica

Para a padronização, foram testadas cinco amostras de músculo bovino e suíno e três amostras para cão, utilizando a matriz carne sob diferentes apresentações: crua refrigerada, crua temperada refrigerada, crua congelada, cozida sem tempero, cozida temperada, cozida congelada e carne em decomposição.

A amostra cárnea foi considerada em decomposição quando apresentou pelo menos três das seguintes características: limosidade na superfície, grande formação de exsudato, descoloração / alteração dos pigmentos cárneos, produção de gás / odores / cores anormais e decomposição da gordura (LAWRIE, 2005).

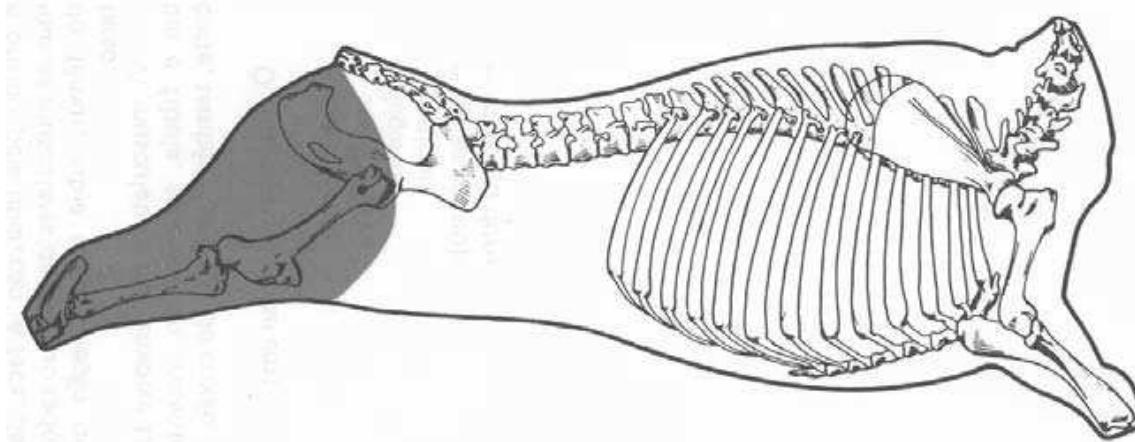
Nos cortes temperados, em cerca de 20g da amostra cárnea, foram adicionados 0,045g de sal, 0,010g de orégano e 0,005g de pimenta do reino, no Laboratório de Higiene Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

No mesmo laboratório, também foi realizada a cocção padronizada das amostras, utilizando 10mL de óleo de soja, por 10' a 100°C.

Todas as amostras coletadas foram armazenadas de acordo com a Portaria da Secretaria Municipal da Saúde (SMS) de São Paulo (SP) nº 1210 de 02 de agosto de 2006, mantidas sob refrigeração até 4 °C e a de congelamento a -18 °C, de acordo com a análise proposta (SÃO PAULO, 2006).

Os cortes utilizados para a padronização foram selecionados por proximidade de região anatômica, optando-se por músculos do membro posterior, como ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Membro posterior (bovino)



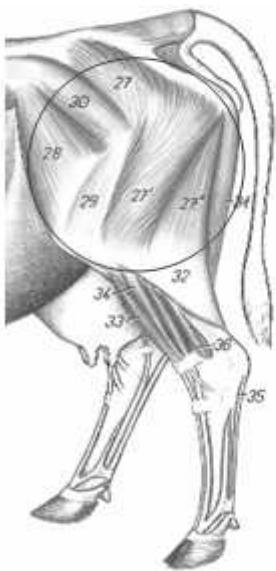
Fonte: (BRASIL, 1988).

De acordo com a Divisão de Padronização e Classificação de Produtos de Origem Animal (DIPAC), essa região compreende os seguintes músculos: isquiocavernoso (no macho), sartório, reto interno (grácil), pectíneo, adutor, semimembranoso, semitendinoso, glúteo bíceps, bíceps femoral, vasto lateral, reto femoral, vasto medial, vasto intermediário, quadrado femoral, gêmeos, obturador externo, obturador interno, extensor digital longo, extensor digital lateral, extensor digital curto, fibular longo (peroneal longo), fibular terceiro (peroneal terceiro), tibial cranial, extensor digital longo do primeiro dedo, gastrocnêmio, sóleo, flexor digital superficial, flexor digital profundo e poplíteo (BRASIL, 1988).

Segundo a Portaria nº05/88, do Ministério da Agricultura, o corte de carne do membro posterior é obtido pela liberação das massas musculares da peça ao redor do fêmur, tíbia e articulação do tarso (a musculatura que envolve tíbia e fíbula, também faz parte do coxão). Essa região pode ser subdividida em: coxão-mole, coxão-duro, lagarto, patinho, músculo-mole e músculo-duro (BRASIL, 1988).

Em relação à espécie bovina (figura 2), foi analisado o músculo de primeira ou músculo-mole, constituído das massas musculares separadas do coxão-duro e coxão-mole, aderidas à face posterior do joelho (articulação fêmuro-tibial).

Figura 2 – Músculos superficiais do membro pélvico de bovino: vista lateral

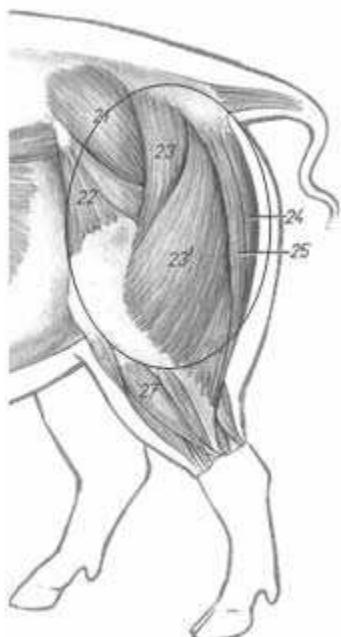


- 27. Porção caudal do músculo bíceps femoral
- 28. Músculo tensor da fáscia-lata
- 29. Músculo vasto lateral
- 30. Músculo glúteo médio
- 31. Músculo semi-tendinoso
- 32. Fáscia crural
- 33. Músculo extensor longo dos dedos
- 34. Músculo peroneal longo
- 35. Tendão do músculo flexor superficial dos dedos
- 36. Músculo flexor profundo dos dedos

Fonte: Popesko (1997) modificado

Quanto à espécie suína (figura 3), foi utilizado o pernil que, em relação ao bovino, comprehende os cortes: coxão mole, coxão duro, lagarto, músculo e patinho.

Figura 3 – Músculos superficiais do membro pélvico de suíno: vista lateral

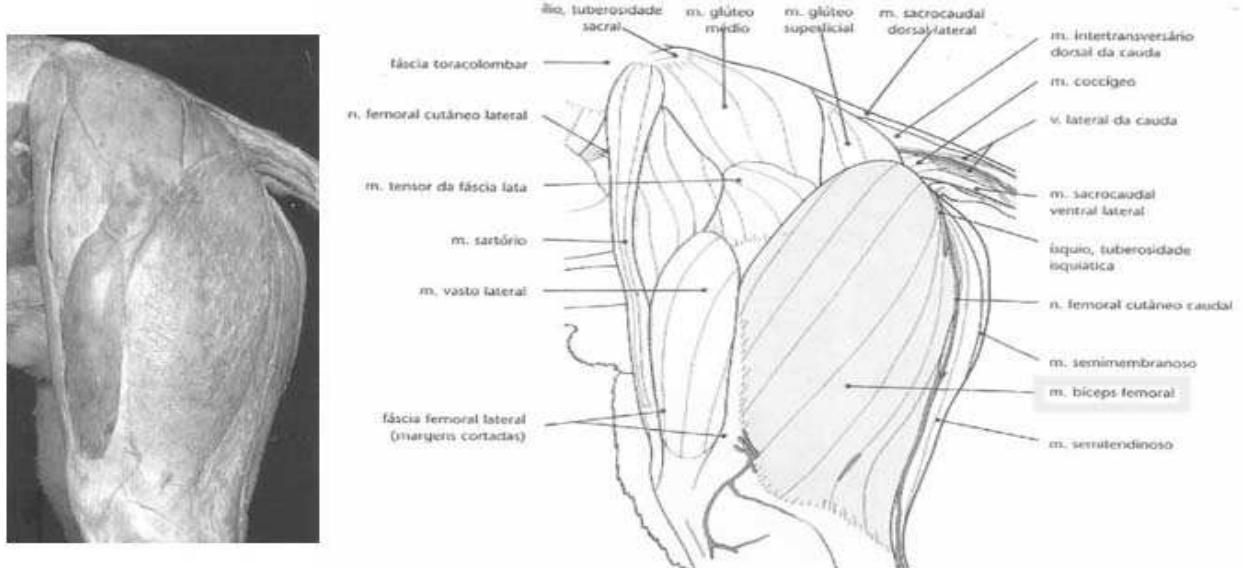


- 21. Músculo glúteo médio
- 22. Músculo tensor da fáscia-lata
- 23. Músculo glúteo superficial
- 23'. Músculo bíceps femoral
- 24. Músculo semimembranoso
- 25. Músculo semitendinoso
- 27. Músculo peroneal longo

Fonte: Popesko (1997) modificado

Em cães (figura 4) foi simulado um corte de carne de membro posterior, correspondente ao músculo bíceps femoral.

Figura 4 – Músculos superficiais do membro pélvico de cão: vista lateral



Fonte: Done et al. (2002) modificado.

Os cortes de carne de bovinos e suínos foram obtidos em diversos Hipermercados nas cidades de Santo André, São Bernardo do Campo e São Paulo, durante o período de novembro de 2007 a abril de 2009. O músculo de cão foi proveniente de animais submetidos a necrópsia pelo Departamento de Patologia Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, durante o mesmo período.

Para definição da especificidade do teste, outras amostras foram coletadas, sendo o músculo equino obtido através de necrópsia realizada no Departamento de Clínica Médica de Equinos, a “carne” de soja (ou seja, proteína de soja) e a carne de coelho foram adquiridas em Hipermercado na cidade de São Paulo, durante o período de janeiro a maio de 2008.

Para verificar o limite de detecção, cada amostra foi diluída em água dietilpirocarbonato (DEPC) na proporção de 0%; 0,001%; 0,01%, 0,1%; 1%; 10%; 25%; 50%, 75% e 100% e, conjuntamente, foram colocados dois controles negativos

(com somente água DEPC, para verificar possíveis contaminações durante a extração de DNA) e um controle positivo (sangue da espécie em questão).

4.2 Análise das amostras obtidas da COVISA

Após padronização da PCR, foram realizadas análises de amostras obtidas a partir de vistorias e inspeções fiscais pela COVISA – Subgerência de Vigilância de Alimentos, da Prefeitura do Município de São Paulo, durante o período de 01 de junho a 15 de novembro de 2009, totalizando 53 amostras.

A Subgerência de Vigilância de Alimentos, da Gerência de Vigilância Sanitária de Produtos e Serviços de Interesse à Saúde, da COVISA tem como área de atuação a Fiscalização Sanitária do Comércio Varejista, Atacadista, Indústrias e Transportadoras de Alimentos, localizados no Município de São Paulo.

As amostras foram coletadas pelos técnicos da COVISA, em sacos plásticos estéreis, lacrados e numerados (figura 5). Foram acondicionados em caixa isotérmica até o seu recebimento na FMVZ/USP. Juntamente foi lavrado termo de coleta de amostra (TCA), de cada uma delas, conforme figura 6 e, preenchido formulário pelas autoridades sanitárias (Apêndice A).



Figura 5 – Amostras da COVISA lacradas

 PREFEITURA DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO Secretaria Municipal da Saúde Coordenação de Vigilância em Saúde - COVISA		Endereço para Envio: Rua 10 de Julho, 2.300 CEP 01020-000
TERMO de COLETA de AMOSTRA - Série D / Nº 12512		
Itens de Identificação: Pessoas-Pessoas: _____ RG: _____ Pessoas-Jurídicas: _____ CNPJ: _____ Endereço: _____ Nº: _____ Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____ Telefone: _____ Fone: _____ E-mail: _____ CCM: _____ Referente / Impachador: _____ CRM: _____ Endereço: _____ Nº: _____ CEP: _____ Complemento: _____ Bairro: _____ CEP: _____ Telefone: _____ Fone: _____ E-mail: _____ Produto: _____ Marca: _____ Fabricante: _____ Veículo: _____ Lata: _____ Quantidade: _____ Registre: _____ Temperatura: _____ Fone: _____ Endereço: _____ Amostra: <input checked="" type="checkbox"/> Oviplasma CF Unica <input type="checkbox"/> 1.1 Análise Física <input type="checkbox"/> 1.1 Biópsia Fisiológica <input type="checkbox"/> 1.1 Eletrônica <input type="checkbox"/> 1.1 Química Especificações: _____ Objetivo: <input type="checkbox"/> Projeto <input checked="" type="checkbox"/> Diagnóstico <input type="checkbox"/> Exerto <input type="checkbox"/> Exemplo: Início da incubação de vírus Especificações: _____ Exame Solicitado: <input checked="" type="checkbox"/> 1.1 Microscópico <input type="checkbox"/> 1.1 Físico Químico <input type="checkbox"/> 1.1 Microbiológico <input type="checkbox"/> 1.1 Composição do Produto <input type="checkbox"/> 1.1 Químico Especificações: _____ Observações: _____		
Autenticação e Encaminhamento: _____ Arquivada Nº 1 a Lacre Nº _____ Arquivada Nº 2 a Lacre Nº _____ Arquivada Nº 3 a Lacre Nº _____ <small>Este documento não tem poder de prova, conforme o disposto no artigo 103 e 104 da Lei 10.710, de 09/05/03.</small> Assinatura do Coletor: _____ N° de Coletor: _____ Data: _____ Prazo: _____ Liberação da amostra via Preparo: _____ Nome: _____ Data: _____ Assinatura: _____ Data: _____ Prazo: _____ <small>O coletor deve informar o responsável pelo envio e assinar este Termo de Envio da Amostra.</small>		
Cônsulenza	Cônsulenza	

Figura 6 – Termo de coleta da amostra (TCA) da COVISA

Na FMVZ/USP as amostras foram identificadas pelo número do lacre e fotografadas, sendo armazenadas congeladas em freezer vertical a temperatura média de -12°C, por até 15 dias antes de serem analisadas. Para cada amostra foram feitas três análises, devido a utilização de três primers diferentes. Os resultados foram apresentados à COVISA em laudo específico (Apêndice B).

5.2 EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras provenientes da padronização ou encaminhadas pela Vigilância Sanitária seguiram o mesmo tipo de procedimento, descrito abaixo.

As amostras de carnes foram obtidas com o auxílio de uma tesoura, colocadas em tubos estéreis e pesadas. Foram selecionadas 20g de amostra cárnea, adicionando-se 80mL de TE TRIS EDTA pH 8.0 (Anexo A). Esse material foi processado no mixer (Back&Decker SB40) por 1', filtrado com papel-filtro e colocado 1000 μ L em tubos graduados de 1,5mL, livres de DNA e ácido ribonucléico (RNA), totalizando três microtubos (dois para congelação, caso seja necessária a repetição da extração).

A extração do DNA foi realizada a partir do produto dessa filtração, com técnica baseada em Chomczinsky (1993) com modificações, utilizando tiocianato de guanidina 5M / Fenol pH 7,5 (Anexo A), conforme descrito abaixo.

Num eppendorf de 1,5mL foi homogeneizado: 600 μ L de Tiocianato de Guanidina (GT) com 200 μ L da amostra cárnea, através do vórtex modelo Maxi MixplusTM – Thermolyne por 15".

Para controle negativo, foi adicionado 200 μ L água DEPC com 600 μ L de GT e também homogeneizado em vórtex durante 15". Na padronização foram utilizados dois controles negativos (somente água DEPC), bem como na análise das amostras encaminhadas pela COVISA.

Após homogeneização, os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10'. O clorofórmio (100 μ L) foi adicionado e homogeneizado em vórtex por 15" e mantido por 10' à temperatura ambiente.

Na centrífuga modelo 5804R – Eppendorf, os microtubos ficaram por 5' a 4°C em 12.000 X g, cerca de 400 μ L do sobrenadante foi transferido para outro tubo previamente identificado com 600 μ L de propanol. Após homogeneização em vórtex por 15", foram mantidos a - 20°C pelo tempo mínimo de duas horas.

Sem prévio descongelamento, os tubos foram centrifugados em 12.000 X g por 20' a 4°C, o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500 μ L de etanol a 70% homogeneizado em vórtex por 15" e novamente centrifugados em 12.000 X g por 10' a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e os microtubos foram secos no termobloco / banho-seco (Thermolyne Type 16500, Dri Bath) a 56°C por 10'. Após secagem, os tubos com os pellets foram ressuspendidos com 20µL de água DEPC, colocados em breve centrifugação no vórtex, incubados a 56°C por 15', homogeneizados no vórtex e deixados sob refrigeração a 4°C, enquanto o mix era preparado.

5.3 AMPLIFICAÇÃO

Devido à alta sensibilidade do teste e o fato de não ocorrer reação cruzada com outras espécies, as seqüências utilizadas como base neste projeto para identificação de espécie bovina e suína foi à mesma de Caldwell et al. (2007) e para identificação da espécie canina a de Gao et al. (2004), já citados anteriormente. Ambos utilizam DNA mitocondrial.

- para bovinos: 5'-CAGCAGCCCTACAAGCAATGT-3' (forward primer) e 5'-GAGGCCAAATTGGGCAGGATTAT-3' (reverse primer). (CALDWELL et al., 2007).
- para suínos: 5'-ACAGCTGCACTACAAGCAATGC-3' (forward primer) e 5'-GGATGTAGTCCGAATTGAGCTGATTAT-3' (reverse primer). (CALDWELL et al., 2007).
- para caninos: 5'-TCCAGGTAAACCCTTCTT-3' (forward primer) e 5'-TACGAGCAAGGGTTGATGG-3' (reverse primer). (GAO et al., 2004).

A amplificação da dupla fita continha no final um volume de 25µL com: 2,5µL de tampão 10 x PCR buffer (Invitrogen®), 4µL de dNTP 1,25 mM (Fermentas®), 0,75µL de Cloreto de magnésio 50mM (Invitrogen®), 1,25µL de cada primer 10uM (IDT®), 12,50µL de água DEPC, 0,25µL de Platinum Taq DNA polimerase 500U (Invitrogen®) e 2,5µL da amostra (após extração do DNA). Valores conforme recomendação do fabricante da Taq DNA (com modificações).

Os DNAs bovino e suíno foram amplificados no termociclador modelo Peltier Thermal Cycler - BioRad, seguindo o perfil: desnaturação inicial à 95°C por 3', 39 ciclos de desnaturação do DNA à 94°C por 30", hibridização dos primers à 60°C por

30", polimerização do DNA à 72°C por 45", extensão final à 72°C por 10' e 10 °C até a retirada das amostras do equipamento (CALDWELL et al., 2007 modificado).

Quanto ao DNA canino, o perfil no mesmo termociclador foi: desnaturação inicial à 95°C por 3', 39 ciclos de desnaturação do DNA à 94°C por 30", hibridização dos primers à 56°C por 30", polimerização do DNA à 72°C por 45", extensão final à 72°C por 10' e 10 °C até a retirada das amostras do equipamento (GAO et al., 2004 modificado).

5.4 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Os fragmentos amplificados foram analisados através da eletroforese realizada em cuba horizontal, com gel de agarose a 1,5% imerso em tampão TBE 0,5X (Anexo A) e submetidos a corrente elétrica.

Na eletroforese foram colocados 2µL de corante (6 x Loading Dye Solution) juntamente com 10µL da amostra amplificada num parafilm para diluição. Após homogeneização, 10µL dessa mistura foi colocada na cuba preparada com agarose (1,5%) solidificada imersa em TBE 0,5X. Para cada pente, foi colocado um poço com 3µL de marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder).

Na cuba foi aplicada uma corrente elétrica por 30' à 100 volts (V), permitindo migração das moléculas de acordo com seu tamanho (padrão utilizado 1 a 10V/cm de gel). Após decorrido o tempo, a placa foi para uma solução com corante fluorescente de brometo de etídio na concentração de 0,5µg/ml (Anexo A).

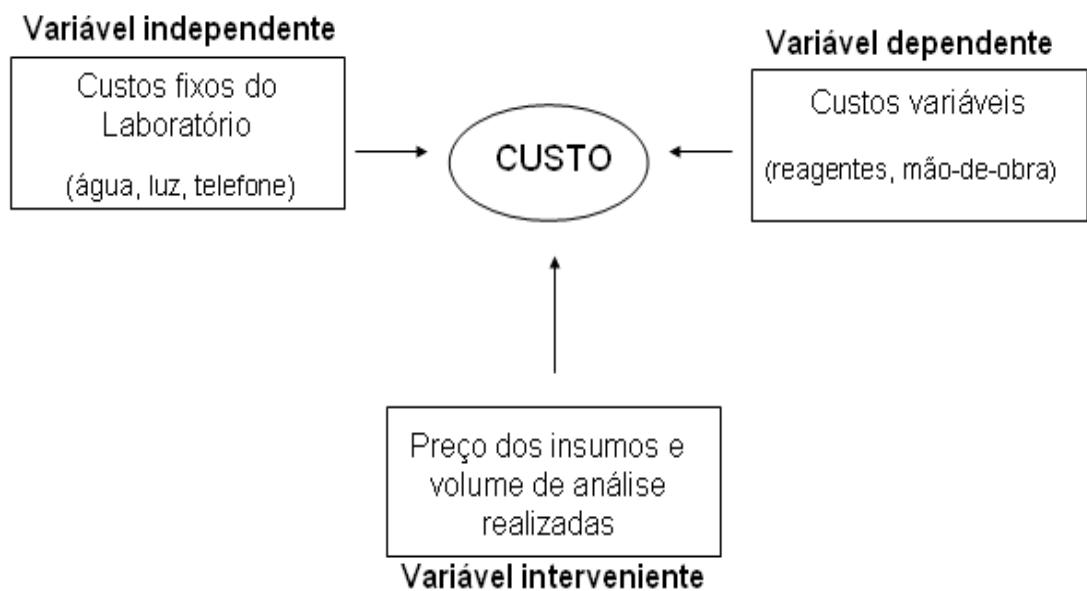
A formação de bandas foi visualizada por transluminação ultravioleta (UV) e fotografada pelo sistema foto-documentação (Alphalmager®, Alpha Innotech) para análise.

Tanto o resultado da padronização, como os das amostras provenientes das vistorias foram analisados através da detecção de banda específica: 191 pares de bases (pb) para bovinos, 196 pb para suínos (CALDWELL et al., 2007) e 213 pb para cães (GAO et al., 2004).

5.5 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS E TEMPO

O método de investigação escolhido foi uma pesquisa exploratória de abordagem quantitativa, para busca de maiores informações sobre determinado assunto, que pouco se conhece, por ser uma investigação empírica, na qual o investigador não tem controle direto sobre as variáveis independentes (MARTINS, 2003). As variáveis estão representadas na figura 7.

Figura 7 - Modelo conceitual de variáveis

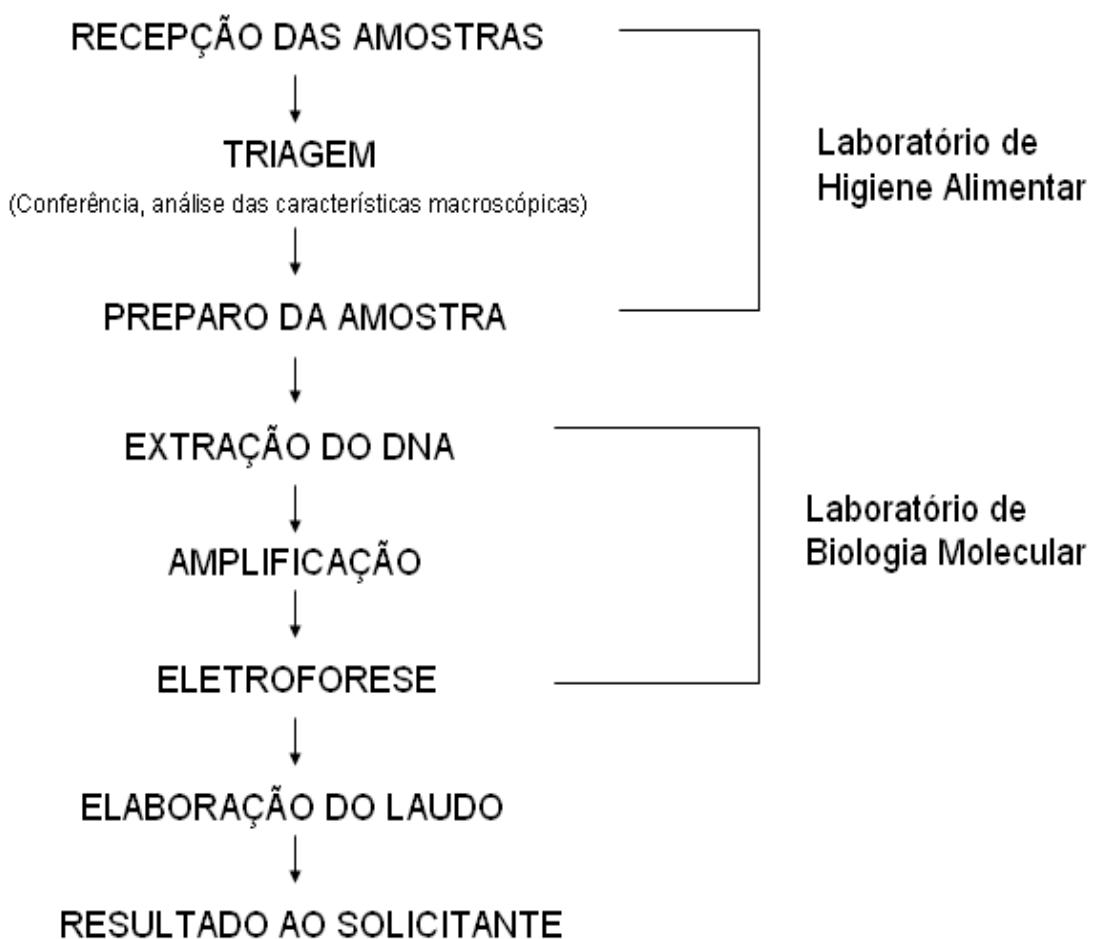


Fonte: Lima (2007) modificado.

Os custos fixos como: energia elétrica, água, telefone, administração, material de escritório, equipamentos, material de limpeza, aluguel e equipamento de proteção individual (EPI) são considerados custos indiretos. Portanto, não foram contabilizados, visto que as amostras foram processadas dentro da FMVZ/USP (amplitude: Laboratório de Higiene e Inspeção de Alimentos e Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia).

Devido ao envolvimento de dois Laboratórios, foi delineado um fluxograma de trabalho (fluxograma 1), que fornece a sequência de atividades, ou seja, as etapas necessárias para realização das análises laboratoriais.

Fluxograma 1 - Atividades envolvidas na realização das análises laboratoriais para identificação da espécie por PCR. São Paulo, 2009



As informações relevantes na triagem foram: aspecto / características macroscópicas, data de recebimento e de processamento, sendo descritas em formulário (Apêndice A).

Para o levantamento de custos, foram construídas planilhas para obtenção dos dados e cálculo dos valores médios.

Os valores dos insumos foram expressos em reais (R\$), com média mensal do dólar variando de U\$ 1,7376 a 2,0601 (compra) no período 01 de maio a 30 de novembro de 2009, de acordo com os Atos Declaratórios Executivos da Receita Federal (BRASIL, [2009]).

Para todos os cálculos foram computados até cinco frações numéricas. Somente no cálculo do custo final foi padronizada a regra de arredondamento de valores, estabelecida pelo Sistema Internacional de Unidades, que estabelece duas casas decimais após a vírgula, arredondando frações de centavos, obedecendo ao seguinte padrão (TOGINHO FILHO; ANDRELLO, [2009]):

- Algarismo menor que 5: Se o algarismo decimal seguinte for menor que 5, o anterior não se modifica.
- Algarismo maior que 5: Se o algarismo decimal seguinte for maior que 5, o anterior incrementa-se em uma unidade.
- Algarismo igual a 5: Se o algarismo decimal seguinte for igual a 5, o anterior incrementa-se em uma unidade caso ele seja ímpar. Caso seja par, o algarismo é conservado.

Os dados referentes à média aritmética (\tilde{x}) do custo bruto (CB_m) dos materiais foram obtidos através de orçamento de, no mínimo, três fornecedores dos materiais e as cotações foram realizadas num período de 6 meses (maio a novembro de 2009). Foram consideradas somente as cotações com as especificações determinadas, através da descrição do produto e quantidade almejada (Apêndice C).

$$CB_m = \frac{Or}{N}$$

CB_m : custo bruto.

Or: somatória dos orçamentos.

N: número de orçamentos.

Como existem dois kits utilizados (Taq DNA polimerase + MgCl₂ + Tampão Buffer e 100BP DNA Ladder + 6X Loading) foi calculado a somatória do volume de

todos os ingredientes para ter o preço do Kit e consequentemente por μL , visto não se possível aferir valor de cada produto individualmente.

A partir dos valores do custo bruto (CB_m), foi calculado o custo por g, mL, μL ou n/mol de cada reagente (CpU_m), visto que, grande parte dos produtos necessários para a PCR é utilizada na forma de solução (preparadas no Laboratório) e não na sua forma bruta ou prontos para o uso (p.a.). Portanto, foi calculado o custo por produto (CpP), para depois realizar a somatória de todos os ingredientes necessários para a preparação de cada solução (CFS).

$$\text{CpP} = \text{CpU}_m \times \text{Vu}$$

CpP : custo por produto.

CpU_m : custo por unidade medida.

Vu : volume utilizado.

CFS: somatória dos CpP

CFS: custo final da solução.

CpP : custo por produto.

Com o valor final de cada solução (CFS) foi possível aferir o custo unitário médio (CUM_a) de cada ingrediente utilizado para a PCR.

$$\text{CUM}_a = \text{QUA} \times \text{CFS} / \text{QTs}$$

CUM_a : custo unitário médio.

QUA: quantidade utilizada por amostra.

CFS: custo final da solução.

QTs: quantidade total da solução.

Para os produtos p.a. (DEPC, propanol e clorofórmio utilizado na extração do DNA) foi realizado somente um cálculo para o custo unitário médio (CUM_b).

$$\mathbf{CUM_b = QUA \times CpU_m}$$

CUM_b: custo unitário médio.

QUA: quantidade utilizada por amostra.

CpU_m: custo por unidade medida.

No cálculo do custo da mão de obra especializada computou-se o valor da hora trabalhada do Técnico de Laboratório I (faixa início IA, código 680, aprovado pela Comissão Central de Recursos Humanos (CCRH) em 24/03/2009, através de levantamento no Departamento de Recursos Humanos da Coordenadoria de Administração Geral - Codage, Universidade de São Paulo, em 21 de setembro de 2009 (Anexo C e D) baseado nos vencimentos com carga horária de 240h mensais.

A remuneração da mão de obra (RMO) foi calculada com base no salário, encargos sociais e benefícios:

- INSS, Fundo de garantia, PIS e outros: 28,5% do salário bruto.
- Insalubridade: 20% do salário mínimo.
- Auxílio transporte: R\$ 9,40 dia útil x qtde de dias/mês (abatimento de 6% no salário bruto).
- Vale-alimentação: R\$ 400,00 / mês.
- Décimo-terceiro: 8% do salário bruto / mês.
- Férias: 8% do salário bruto + 1/3.

Com o RMO foi possível calcular o custo da mão de obra por hora e por segundo.

$$\mathbf{RTH= RMO / 240h}$$

RTH: remuneração de trabalho por hora.

RMO: remuneração da mão de obra.

240h: carga horária mensal estimada pelo Recursos Humanos da FMVZ/USP.

Como é necessário estimar o tempo gasto pela mão de obra, foi calculado o tempo através da média durante três aferições em dias diferentes, em cada etapa do procedimento.

Etapas consideradas: recebimento da amostra (T1), triagem (T2), preparo da amostra (T3), extração do DNA (T4), amplificação (T5), eletroforese (T6), elaboração do laudo de resultado (T7).

Em cada etapa foi mensurado um tempo, totalizando sete tempos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, e T7), gerando o tempo gasto total (TG_t).

$$\mathbf{TG_t: T1 + T2 + T3 + T4 + T5 + T6 + T7}$$

$$\mathbf{MTG_t: TG_t / Af}$$

MTG_t : média do tempo gasto total.

TG_t : tempo gasto total.

Af: número de aferições.

A mensuração do tempo despendido foi feita com um cronômetro de minuto decimal. O tempo gasto médio não inclui processos em que a amostra encontra-se à -20°C, no termociclador, na corrida da eletroforese ou em qualquer etapa na qual é necessário o aguardo de mais de 10 minutos, pois nesse caso, o técnico está apto a desempenhar outras atividades.

Nos tempos T4, T5 e T6 o cálculo foi em relação à análise de uma amostra juntamente com um controle negativo e um controle positivo.

A partir da média do tempo gasto total (TG_t), foi calculado o custo da mão de obra em relação à hora.

$$\mathbf{CCMO= MTG_t \times RTH}$$

CCMO: Cálculo do custo da mão de obra.

MTG_t : média do tempo gasto total.

RTH: Remuneração de trabalho por hora.

Para a realização do custo total direto médio do teste (CTDM), a aferição foi baseada na somatória dos custos unitários médios mais o cálculo do custo de mão de obra.

CTDM= SCUM + CCMO

CTDM: Custo Total Direto Médio do teste.

SCUM: somatória dos custos médios (CUM_a e CUM_b).

CCMO: cálculo do custo de mão de obra.

O cálculo do custo final foi baseado na somatória do custo total direto médio do teste.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

Os resultados da padronização da técnica, limiar mínimo de detecção, análise das amostras da COVISA e levantamento de custos estão descritos a seguir.

6.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

Não houve formação de banda na PCR com amostras de carne de eqüino, de coelho e proteína de soja, não havendo resultado falso positivo ou reação cruzada, como ilustrado na figura 8 (no caso, para a espécie suína).

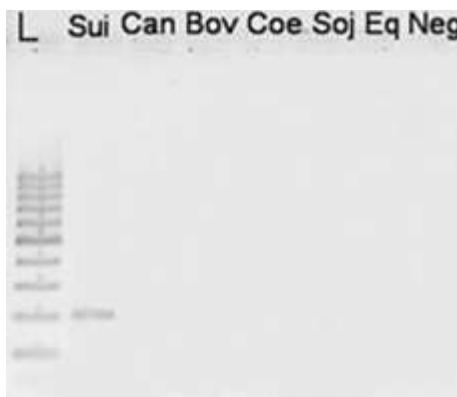


Figura 8 - Gel de agarose: especificidade de suíno.

L: marcador de peso molecular; Sui: amostra de carne de suíno; Can: amostra de músculo de cão; Bov: amostra de carne de bovino; Coe: amostra de carne de coelho; Soj: amostra de proteína de soja; Eq: amostra de músculo eqüino; Neg: controle negativo (100% água DEPC).

A apresentação do produto (refrigerado, congelado, cru, cozido, temperado ou adicionado de outros ingredientes) não interferiu no processo.

6.1.1 Limiar mínimo de detecção

Obteve-se 0,1% como limite mínimo de detecção para bovino (figura 9), 0,01% para suíno (figura 9) e 10% para cão (figura10).



Figura 9 - Perfil das bandas no gel de agarose (bovino e suíno)

Primeira linha: 1. 100% água DEPC; 2. 0,001% carne suína; 3. 0,01% carne suína; 4. Controle negativo (100% água DEPC); 5. 0,1% carne suína; 6. 1% carne suína; 7. 10% carne suína; 8. 25% carne suína; 9. 50% carne suína; 10. 75% carne suína; 11. 100% carne suína; 12. Controle negativo (100% água DEPC); 13. Controle negativo mix; L. Marcador de peso molecular.

Segunda linha: 1. 100% água DEPC; 2. 0,001% carne bovina; 3. 0,01% carne bovina; 4. 0,1% carne bovina; 5. 1% carne bovina; 6. Controle negativo (100% água DEPC); 7. 10% carne bovina; 8. 25% carne bovina; 9. 50% carne bovina; 10. 75% carne bovina; 11. 100% carne bovina; 12. Controle negativo (100% água DEPC); 13. Controle negativo do mix; L. Marcador de peso molecular.

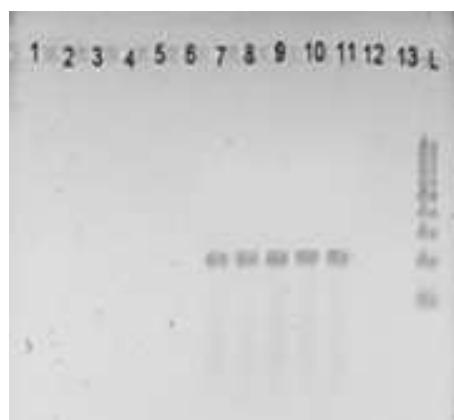


Figura 10 - Perfil das bandas no gel de agarose (canino)

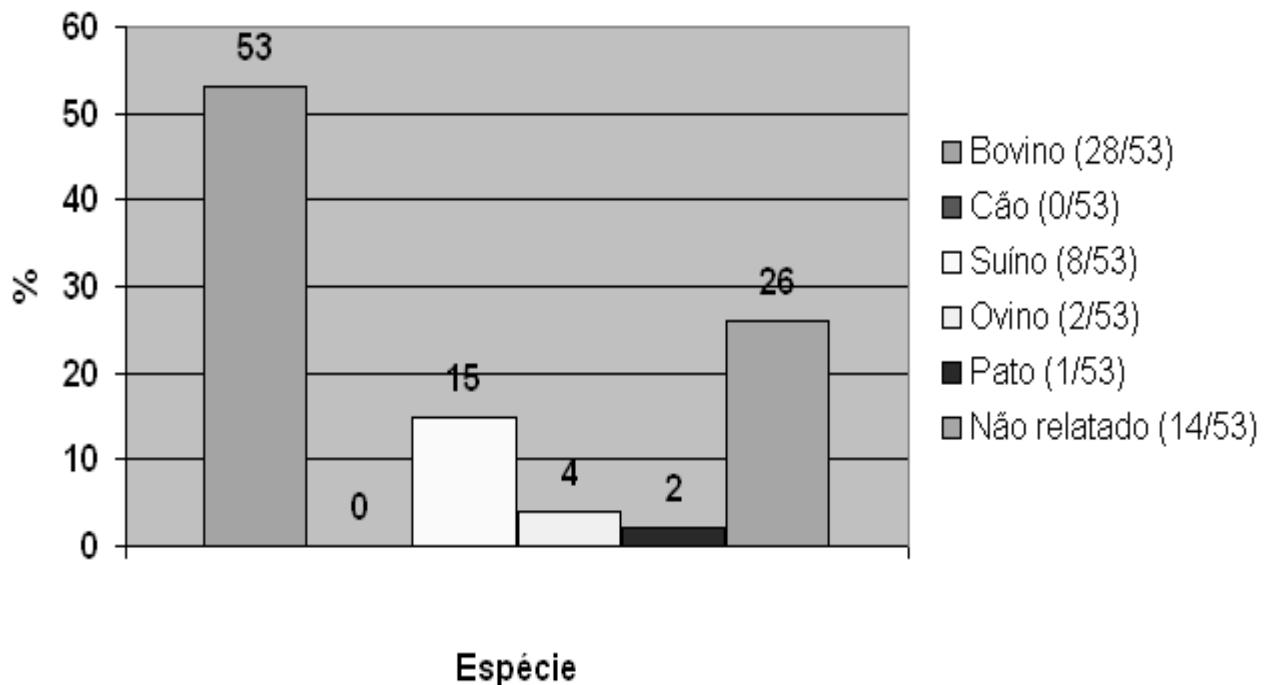
1. 100% água DEPC; 2. 0,001% músculo canino; 3. 0,01% músculo canino; 4. 0,1% músculo canino; 5. 1% músculo canino; 6. Controle negativo (100% água DEPC); 7. 10% músculo canino; 8. 25% músculo canino; 9. 50% músculo canino; 10. 75% músculo canino; 11. 100% músculo canino; 12. Controle negativo (100% água DEPC); 13. Controle negativo mix; L. Marcador de peso molecular.

6.2 AMOSTRAS DA COVISA

No período da pesquisa, a Vigilância Sanitária do Município de São Paulo encaminhou 53 amostras provenientes de 20 restaurantes coreanos vistoriados, nos bairros da Liberdade, Aclimação e Bom Retiro.

Nas vistorias, quando da coleta de amostras foi perguntado ao representante do estabelecimento (proprietário ou funcionário que acompanhou a fiscalização) qual o tipo de carne estava sendo coletada, sendo relatado (gráfico 1): 28/53 (52,83%) como espécie bovina, 8/53 (15,09%) como espécie suína, 2/53 (3,77%) como ovina, 1/53 (1,89%) como carne de pato, 0 (0%) como espécie canina e, em 14/53 (26,42%) amostras não foi informada à espécie.

Gráfico 1 – Amostras encaminhadas pela COVISA, segundo a espécie*, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009



* informações obtidas no estabelecimento vistoriado

As amostras vieram em diversas formas de apresentação, as principais características macroscópicas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Principais características macroscópicas das amostras coletadas nas vistorias realizadas pela COVISA, durante o período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009

Amostras coletadas	Quantidade
Carne crua, refrigerada, sem tempero	6
Carne crua, refrigerada, sem tempero, tipo "carpaccio"	2
Carne crua, refrigerada, temperada	4
Carne crua, congelada, sem tempero	6
Carne crua, congelada, temperada	4
Carne cozida, refrigerada, sem tempero	1
Carne cozida, congelada, temperada	1
Carne com osso, crua, refrigerada, sem tempero	1
Carne com osso, crua, refrigerada, temperada	1
Carne com osso, crua, congelada, sem tempero	5
Carne com osso, com gordura, crua, congelada	1
Carne com osso, com gordura, cozida, congelada, temperada	1
Carne com osso, com gordura, cartilagem, crua, refrigerada	2
Carne com osso, pêlos, cozida, congelada, temperada	2
Carne com gordura, crua, refrigerada, sem tempero	2
Carne com gordura, cozida, temperada	1
Carne com gordura, crua, congelada temperada	2
Carne com gordura, pele, crua, refrigerada	1
Carne com gordura, pele, crua, congelada	1
Carne com gordura, casco, crua, refrigerada	1
Carne fibrosa (consistência firme), congelada, temperada	1
Carne moída, crua, refrigerada, temperada	1
Carne moída, crua, refrigerada, sem tempero	1
Carne defumada, peça única, congelada, temperada	1
Carnes defumadas, três peças, com gordura, cozida, temperada	1
Tripa congelada	1
Tripa em trança refrigerada (conteúdo intestinal)	1
Lingüiça (carne previamente moída, com pouca quantidade de gordura, temperada embutida)	1
TOTAL	53

Os resultados das amostras encaminhadas pela COVISA provenientes de restaurantes vistoriados em São Paulo, por ordem numérica de lacre estão citadas no quadro 2.

Quadro 2 – Resultado do PCR das amostras encaminhadas pela COVISA provenientes de restaurantes vistoriados em São Paulo, por ordem numérica de lacre, no período de junho a novembro de 2009 – São Paulo – 2009.

(continua)

LACRE	TCA n°	AMOSTRA *	RESULTADO	OBSERVAÇÃO
7309	13037	Não informada	Não identificado	Falta de primer específico ¹
7312	13034	Não informada	Suína	
7313	13033	Não informada	Bovina e Suína	Contaminação
10499	Não recebido	Não informada	Bovina	
10501	Não recebido	Não informada	Bovina	
12512	12512	Pato	Não identificado	Falta de primer específico ²
12513	12513	Suína	Suína	
12514	12514	Bovina	Bovina	
12515	12515	Bovina	Bovina	
12516	12516	Bovina	Bovina	
12517	12517	Bovina	Bovina	
12518	12518	Bovina	Bovina	
12519	12519	Bovina	Bovina	
12520	12520	Bovina	Bovina	
12521	12521	Bovina	Bovina	
12522	12522	Suína	Suína	
15744	13032	Não informada	Bovina	
15745	13036	Não informada	Bovina e Suína	Contaminação
15753	13035	Não informada	Bovina e Suína	Contaminação
15754	13038	Não informada	Não identificado	Falta de primer específico ³
15756	13031	Não informada	Bovina	
15757	1473	Não informada	Suína	
16077	12557	Bovina	Bovina	
16078	12554	Bovina	Bovina	
16079	12554	Suína	Suína	
16080	12553	Bovina	Bovina	
17425	12567	Bovina	Bovina	
17982	12509	Bovina	Bovina	
17983	12510	Bovina	Bovina	
18083	12563	Bovina	Bovina	
18701	13029	Não informada	Bovina	
18702	13028	Não informada	Bovina	
18703	13027	Não informada	Não identificado	Falta de primer específico ⁴
18704	12776	Não informada	Bovina e Suína	Lingüiça caseira
18710	13026	Não informada	Suína	
19811	12551	Bovina	Bovina	
19812	12552	Bovina	Bovina	
19813	12561	Bovina	Bovina	
19814	12561	Bovina	Bovina	
19819	12562	Bovina	Bovina	
19820	12552	Suína	Suína	
19822	12555	Bovina	Bovina	
19823	12555	Bovina	Bovina	
19869	12511	Bovina	Bovina	
19891	12572	Suína	Suína	

(conclusão)

LACRE	TCA n°	AMOSTRA *	RESULTADO	OBSERVAÇÃO
19894	12569	Suína	Suína	
19895	12573	Bovina	Bovina	
19896	12574	Ovina	Não identificado	Falta de primer específico ⁵
19897	12571	Suína	Suína	
19898	12568	Bovina	Bovina	
19899	12570	Suína	Suína	
19900	12574	Ovina	Não identificado	Falta de primer específico ⁵
28469	12566	Bovina	Bovina	

* espécie relatada pelo proprietário do estabelecimento durante a coleta.

¹ semelhança macroscópica: carne de avestruz

² semelhança macroscópica: carne de pato

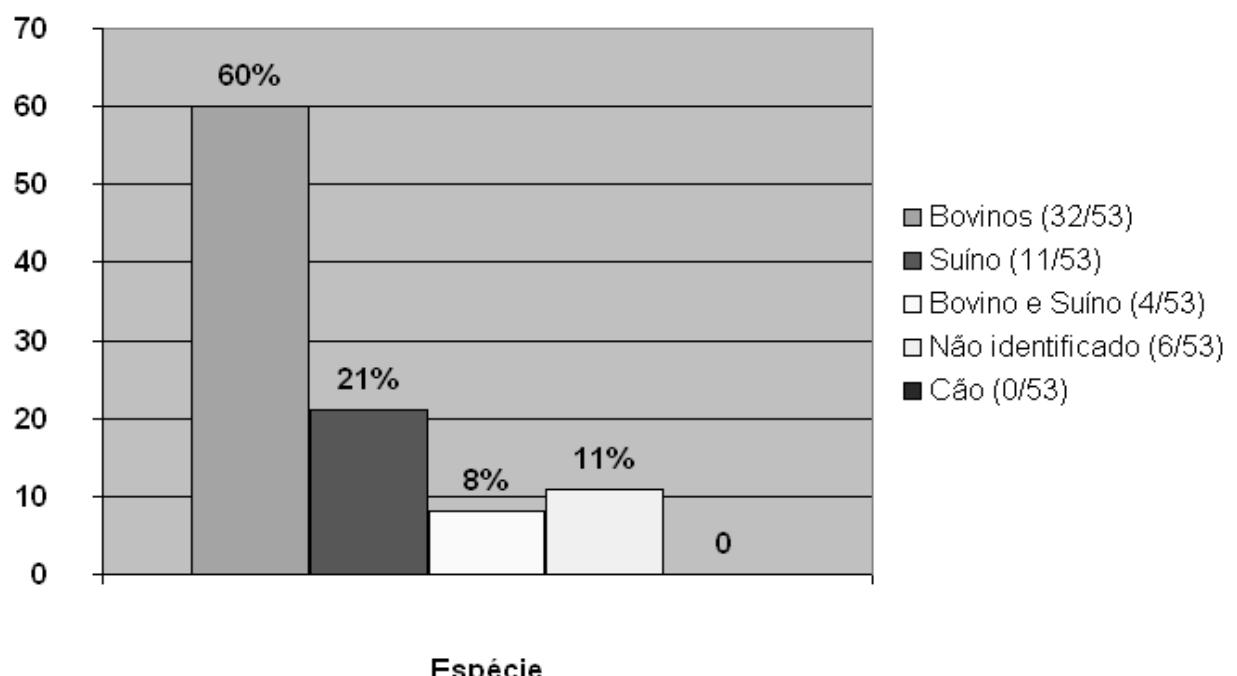
³ semelhança macroscópica: peixe

⁴ semelhança macroscópica: carne de frango

⁵ semelhança macroscópica: carne ovina

Das amostras submetidas à reação em cadeia pela polimerase, 32/53 (60,38%) foram da espécie bovina, 11/53 (20,75%) da espécie suína, 6/53 (11,32%) de espécie não identificada, 4/53 (7,55%) apresentaram banda para a espécie bovina / suína e 0/53 (0%) da espécie canina. Dados representados no gráfico 2.

Gráfico 2 – Resultado das amostras encaminhadas pela COVISA, no período de junho a novembro de 2009 - São Paulo - 2009



Todas as amostras analisadas geraram um laudo (Apêndice B), encaminhado à COVISA.

6.3 LEVANTAMENTO DE CUSTOS E TEMPO

Com base nos orçamentos, foi feito a média do custo bruto (CB_m) e o custo por g, mL, μ L ou por n/mol de cada reagente (CpU_m), conforme quadro 3.

Quadro 3 – Custo unitário de reagentes utilizados para identificação da espécie na PCR, valores aferidos de maio a novembro de 2009 - São Paulo - 2009

(continua)

REAGENTES	ORÇAMENTOS R\$ (Or) ¹	MÉDIA R\$ (CB_m) ²	CUSTO R\$ (CpU_m) ³ por g, mL, μ L ou n/mol
Tiocianato de Guanidina	1640,00 1.706,00 227,00 1053,28	1.156,57	2,31314/g
Tris base	80,00	80,00	0,8/g
Tris HCl	202,32 149,00	175,66	1,7566/g
Na ₂ EDTA	164,00 119,00	141,50	1,415/g
Fenol	108,00	108,00	1,08/mL
NaOH	13,81	13,81	0,05524/g
Glicogênio	315,52	315,52	3,1552/ μ L
Clorofórmio p.a.	81,90 81,90 78,00	80,60	0,0806/mL
Propanol p.a.	178,50 68,60	123,55	1,2355/mL
Etanol p.a.	81,20 81,20	81,20	0,0812/mL
Acido Bórico	114,10 119,00 170,00	134,36666	0,26873/g
Água destilada	9,36	9,36	0,00936/mL
Água destilada ultrapura (livre de DNA e RNA)	190,00	190,00	0,19/mL
Água DEPC	643,33 250,56	446,945	0,44694/mL

(conclusão)

REAGENTES	ORÇAMENTOS R\$ (Or) ¹	MÉDIA R\$ (CB _m) ²	CUSTO R\$ (CpU _m) ³ por g, mL, µL ou n/mol
dNTP SET 100mM: dATP, dCTP, dGTP, dTTP	290,00 369,00 864,90 1081,12	651,255	0,65125/µL
Primer bovino forward	40,95 35,70	38,325	1,21281/nmol
reverse	42,90 37,40	40,15	1,10606/nmol
Primer Suíno forward	42,90 37,40	40,15	1,17742/nmol
reverse	52,65 45,90	49,275	1,39589/nmol
Primer Cão forward	35,10 30,60	32,85	1,38608/nmol
reverse	37,05 32,30	34,675	0,95261/nmol
Taq DNA polimerase + MgCl ₂ + Tampão Buffer	100,00 280,00 246,00	208,66666	0,05796/µL
Agarose para eletroforese	565,64 2700,00 786,64 615,00 540,00	1.041,456	10,41456/g
Brometo de etídio	442,75	442,75	14,75833/mL
100BP DNA Ladder + Corante 6 X Loading	140,00 390,00 445,44	325,14666	0,30966/µL

¹ Or: orçamentos² CB_m: custo bruto³ (CpU_m): custo por unidade medida

Devido ao elevado número de soluções preparadas no Laboratório, inicialmente, foi calculado o custo por produto (CpP) e realizado o custo total da solução (CFS), conforme quadro 4.

Quadro 4 – Custos das soluções preparadas no LABMAS para PCR, no período de maio a novembro de 2009 - São Paulo - 2009

(continua)

SOLUÇÃO	ÍTEM	VOLUME (Vu) ¹	CUSTO R\$ (CpP) ²	TOTAL R\$ (CFS) ³	QTDE (QtS) ⁴
TRIS HCl 1M	a)TRIS HCl 1M pH 7.5 b)Água destilada	121,1g 800mL	121,72426 152,00	273,72426	800mL
Na ₂ EDTA 0,5M pH 8.0	a)EDTA Sal dissódico b) Água destilada c) NaOH (ajuste pH)	186,1g 800mL x:20g	263,3315 152,00 1,1048	416,4363	800mL
GT 5M fenol pH 7.5	Isotiocianato de guanidina TRIS HCl 1M Na ₂ EDTA 0,25M pH 8.0 (Na ₂ EDTA 0,5M + água destilada) d) Água destilada e) Fenol pH 7.5 f) Glicogênio	60g 5mL 5mL 5mL 90mL 100mL 20 µL	138,7884 1,71077 2,6027 0,95 17,10 108,00 0,06310	269,21497	200mL
Etanol 70%	a) Etanol p.a. b) Água destilada	70mL 30mL	5,684 5,70	11,384	100mL
TE TRIS EDTA pH 8.0	a) TRIS HCl 1M b) Na ₂ EDTA 0,5M c) Água destilada	5mL 1mL 94mL	1,71077 0,52054 93,86	95,91131	500mL
dNTP 10mM	a) dATP, dGTP, dCTP, dTTP b) Água destilada	10µL cd 60µL	26,05 0,0114	26,0614	100µL
dNTP 1,25mM (*)	a) dNTP 10mM b) Água destilada	62,5µL 437,50µL	16,28812 0,08312	16,37124	500µL
Brometo de etídeo	a) Brometo de etídio b) Água destilada	25µL 500mL	0,36895 4,68	5,04895	500mL
100bp Ladder	a) DNA Ladder b) 6x DNA Loading Dye c) Água destilada	10µL 10µL 40µL	3,0966 3,0966 0,0076	6,2008	60µL
Primer 1 (solução mãe)	a) Primer bovino f b) Água destilada a) Primer bovino r b) Água destilada	36,3nmol 363 µL 31,6nmol 316 µL	38,325 0,06897 40,15 0,06004	38,39397 40,21004	363 µL 316 µL
Primer 1 (1:10)	a) Solução mãe1 f b) Água destilada a) Solução mãe1 r b) Água destilada	20µL 180 µL 20µL 180 µL	2,11537 0,0342 2,54113 0,0342	2,14957 2,57533	200µL 200µL
Primer 2 (solução mãe)	a) Primer suíno f b) Água destilada a) Primer suíno r b) Água destilada	34,1nmol 341 µL 35,3nmol 353 µL	40,15 0,06479 49,275 0,06707	40,21479 49,34207	341 µL 353 µL

(conclusão)

SOLUÇÃO	ÍTEM	VOLUME (Vu) ¹	CUSTO R\$ (CpP) ²	TOTAL R\$ (CFS) ³	QTDE (QTs) ⁴
Primer 2 (1:10)	a) Soluç. Mãe 2 f b) Água destilada a) Soluç. mãe 2 r b) Água destilada	20µL 180µL 20µL 180µL	2,35863 0,0342 2,79558 0,0342	2,39283 2,82978	200µL 200µL
Primer 3 (solução mãe)	a) Primer cão f b) Água destilada a) Primer cão r b) Água destilada	23,7nmol 237 µL 36,4nmol 364µL	32,85 0,04503 34,675 0,06916	32,89503 34,74416	237µL 364µL
Primer 3 (1:10)	a) Soluç. Mãe 3 f b) Água destilada a) Soluç. mãe 3 r b) Água destilada	20µL 180µL 20µL 180µL	2,77595 0,0342 1,90901 0,0342	2,81015 1,94321	200µL 200µL
TBE 10X	a) TRIS base b) Ácido bórico c) Na ₂ EDTA d) Água destilada	10,8g 5,5g 0,83g 500mL	1,728 1,47801 0,97479 95,00	99,1808	500mL
TBE 0,5X	a) TBE 10X b) Água destilada	25mL 475mL	4,9709 90,25	95,2209	500mL
Agarose 1,5%	a) Agarose b) TBE 0,5X	1,5g 100mL	15,62184 19,044	36,665	100mL

^(*) concentração inicial x volume inicial= concentração final x volume final¹ Vu: volume utilizado² CpP: custo por produto³ CFS: custo final da solução⁴ QTs: quantidade total da solução preparada

Com a quantidade total de solução preparada (QTs) e o valor final de cada solução (CFS) foi possível aferir o custo unitário médio (CUM_a) da solução utilizada para a PCR. Nos produtos prontos para o uso, só foi calculado o custo unitário médio dos produtos p.a (CUM_b).

O valor total da PCR contabilizados com o primer específico de cada espécie e amostra única (sem controles) estão no quadro 5.

Quadro 5 – Reagentes utilizados na PCR para identificação da espécie, com amostra única, no Laboratório de Higiene Alimentar e LABMAS - São Paulo - 2009

(continua)

ESPÉCIE BOVINA		
REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA POR AMOSTRA (QUA)¹	CUSTO (CUM_a)² ou (CUM_b)³
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	15,3456
Solução de GT	600µL	0,80764
Clorofórmio	100µL	0,00806
Propanol	600µL	0,7413
Solução de Etanol a 70%	500µL	0,05692
Água destilada ultrapura	20µL	0,0038
Solução dNTP 1,25mM	4µL	0,13096
Primers bovino forward reverse	1,25µL 1,25µL	0,01344 0,0161
Taq DNA polimerase	0,25µL	0,01449
Cloreto de magnésio	0,75µL	0,04347
Tampão Buffer 10X PCR	2,5µL	0,1449
DEPC	12,5µL	0,00559
Solução Agarose 1,5%	30mL	10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL	5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL	0,31005
TOTAL (R\$)		33,69

ESPÉCIE SUÍNA		
REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA POR AMOSTRA (QUA)¹	CUSTO (CUM_a)² ou (CUM_b)³
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	15,3456
Solução de GT	600µL	0,80764
Clorofórmio	100µL	0,00806
Propanol	600µL	0,7413
Solução de Etanol a 70%	500µL	0,05692
Água destilada ultrapura	20µL	0,0038
Solução dNTP 1,25mM	4µL	0,13096
Primers suíno forward reverse	1,25µL 1,25µL	0,01495 0,01767
Taq DNA polimerase	0,25µL	0,01449
Cloreto de magnésio	0,75µL	0,04347
Tampão Buffer 10X PCR	2,5µL	0,1449
DEPC	12,5µL	0,00559
Solução Agarose 1,5%	30mL	10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL	5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL	0,31005
TOTAL (R\$)		33,69

(conclusão)

CÃO		
REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA POR AMOSTRA (QUA)¹	CUSTO (CUM_a)² ou (CUM_b)³
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	15,3456
Solução de GT	600µL	0,80764
Clorofórmio	100µL	0,00806
Propanol	600µL	0,7413
Solução de Etanol a 70%	500µL	0,05692
Água destilada ultrapura	20µL	0,0038
Solução dNTP 1,25mM	4µL	0,13096
Primers cão forward reverse	1,25µL 1,25µL	0,01756 0,01215
Taq DNA polimerase	0,25µL	0,01449
Cloreto de magnésio	0,75µL	0,04347
Tampão Buffer 10X PCR	2,5µL	0,1449
DEPC	12,5µL	0,00559
Solução Agarose 1,5%	30mL	10,9995
Solução Brometo de etídio	500mL	5,04895
Solução 100BP DNA Ladder	3µL	0,31005
TOTAL (R\$)		33,69

¹QUA: quantidade utilizada por amostra²CUM_a: custo unitário médio da solução³CUM_b: custo unitário médio dos produtos p.a

É Importante ressaltar que na realização de uma PCR deve ser colocado juntamente com a amostra, um controle negativo e um positivo da reação. Portanto, o valor deve ser contabilizado sobre a amostra e seus controles, como no quadro 6.

Quadro 6 – Reagentes utilizados para PCR, com uma amostra e dois controles (positivo e negativo), no Laboratório de Higiene Alimentar e LABMAS São Paulo - 2009

REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA (QUA) ¹			CUSTO (CUM _a) ² ou (CUM _b) ³
	A	C-	C+	
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	-	80mL	30,6912
Solução de GT	600µL	600µL	600µL	2,42293
Clorofórmio	100µL	100µL	100µL	0,02418
Propanol	600µL	600µL	600µL	2,2239
Solução de Etanol a 70%	500µL	500µL	500µL	0,17076
Água destilada ultrapura	20µL	220 µL	20 µL	0,0494
Solução dNTP SET	4µL	4µL	4µL	0,39288
<i>x</i> dos primers forward reverse	1,25µL 1,25µL	1,25µL 1,25µL	1,25µL 1,25µL	0,04595 0,04592
Taq DNA polimerase	0,25µL	0,25µL	0,25µL	0,04347
Cloreto de magnésio	0,75µL	0,75µL	0,75µL	0,13041
Tampão Buffer	2,5µL	2,5µL	2,5µL	0,4347
DEPC	12,5µL	12,5µL	12,5µL	0,01676
Solução Agarose 1,5%		30mL		10,9995
Solução Brometo de etídio		500mL		5,04895
Solução 100BP DNA Ladder		3µL		0,31005
TOTAL (R\$)				53,05

¹ QUA: quantidade utilizada por amostra

² CUM_a: custo unitário médio da solução

³ CUM_b: custo unitário médio dos produtos p.a

A: amostra, C-: controle negativo, C+: controle positivo

Esse cálculo é referente a extração de DNA para uma espécie, como para cada amostra é necessário fazer triplicata devido ao uso de três primers diferentes, fato que gera um custo inicial maior, foi realizado (com sucesso) um procedimento de fazer triplicata somente a partir do mix (etapa de fato, em que é adicionado os primers). O custo final foi de R\$ 55,27 para identificação das três espécies, conforme expresso no quadro 7.

Quadro 7 – Reagentes utilizados para PCR, com uma amostra e dois controles (positivo e negativo) e triplicata a partir do mix - São Paulo - 2009

REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA (QUA) ¹			CUSTO (CUM _a) ² ou (CUM _b) ³
	A	C-	C+	
TE TRIS EDTA pH 8.0	80mL	-	80mL	30,6912
Solução de GT	600µL	600µL	600µL	2,42293
Clorofórmio	100µL	100µL	100µL	0,02418
Propanol	600µL	600µL	600µL	2,2239
Solução de Etanol a 70%	500µL	500µL	500µL	0,17076
Água destilada ultrapura	20µL	220 µL	20 µL	0,0494
Solução dNTP SET	12µL	12µL	12µL	1,17864
<i>x</i> dos primers forward reverse	3,75µL 3,75µL	3,75µL 3,75µL	3,75µL 3,75µL	0,13785 0,13776
Taq DNA polimerase	0,75µL	0,75µL	0,75µL	0,13041
Cloreto de magnésio	2,25µL	2,25µL	2,25µL	0,39123
Tampão Buffer	7,5µL	7,5µL	7,5µL	1,3041
DEPC	37,5µL	37,5µL	37,5µL	0,05028
Solução Agarose 1,5%		30mL		10,9995
Solução Brometo de etídio		500mL		5,04895
Solução 100BP DNA Ladder		3µL		0,31005
TOTAL (R\$)				55,27 (SCUM)⁴

¹ QUA: quantidade utilizada por amostra

² CUM_a: custo unitário médio da solução

³ CUM_b: custo unitário médio dos produtos p.a

⁴ SCUM: somatória dos custos unitários médios

A: amostra, C-: controle negativo, C+: controle positivo

Mix

O cálculo da remuneração da mão de obra (RMO) do técnico nível IA, foi realizado com base no salário, encargos sociais e benefícios. Sendo salário bruto considerado de R\$ 1.678,75 (Anexo D).

- INSS, Fundo de garantia, PIS e outros: 28,5% do salário bruto = R\$ 478,44.
- Insalubridade: 20% do salário mínimo (R\$ 465,00) = R\$ 93,00.
- Auxílio transporte: R\$ 9,40 dia útil x qtde de dias/mês (abatimento de 6% no salário bruto). Média de 20 dias: R\$ 188,00 (abatimento de R\$ 100,73 mês).
- Vale-alimentação = R\$ 400,00 / mês.
- Décimo-terceiro: 8% do salário bruto / mês = R\$ 134,30.
- Férias: 8% do salário bruto + 1/3 desse valor = R\$ 179,07.

Pelos cálculos citados, a remuneração da mão de obra é de R\$ 3.050,83, com este valor foi calculado a remuneração da mão de obra por hora R\$ 12,71 (RTH).

Foi estimada a média do tempo gasto total (tabela 2) para a realização de toda a análise, em todas as etapas: da triagem à elaboração do laudo.

Tabela 2 – Determinação do tempo, em horas, para a realização de PCR de uma amostra e dois controles (positivo e negativo) nos Laboratórios de Higiene Alimentar e LABMAS, com triplicata a partir do mix, no período de julho a novembro de 2009 – São Paulo – 2009

DATA	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	TOTAL(TG_t)¹
22/07/09	4'05"	4'59"	12'28"	2h44'13"	7'24"	10'04"	5'22"	3h27'55"
28/08/09	4'17"	5'12"	11'57"	2h38'59"	8'56"	10'38"	4'59"	3h23'38"
16/11/09	7'14"	5'53"	13'05"	2h56'39"	8'27"	11'44"	5'34"	3h47'56"

Média do tempo gasto total (MTG_t): 3h33'23"

T1: recebimento da amostra, T2: triagem, T3: preparo da amostra, T4: extração do DNA, T5: amplificação, T6: eletroforese, T7: elaboração do laudo.

¹ (TG_t): tempo gasto total

Com a média do tempo gasto total (MTG_t) foi calculado o custo da mão de obra (CCMO) em relação ao tempo (3h33'23"), obtendo-se R\$45,20.

Para o custo total direto médio do teste (CTDM) foi realizada a somatória do custo da mão de obra (CCMO) e dos reagentes através da somatória dos custos unitários médios (SCUM), totalizando R\$ 100,47.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Para a realização da padronização de uma técnica laboratorial é indispensável que sejam seguidas as Boas Práticas Laboratoriais. São considerados pontos críticos de controle: o preparo da amostra, dos reagentes e soluções, além dos equipamentos e utensílios.

Em relação às amostras: devem ser coletadas com a utilização de luvas e sacos plásticos estéreis. Quando a amostra vier congelada, o descongelamento deve ser realizado separadamente para cada carne (para evitar “contaminação” pelo exsudato).

É importante garantir que os reagentes sejam preparados dentro dos limites pré-estabelecidos e que os resultados sejam reproduutíveis e confiáveis (GARFIELD, 1994). Todas as soluções devem ser rotuladas com nome, concentração, data do preparo / validade, responsável pelo fracionamento / preparação e condições de armazenamento.

Os equipamentos necessitam ser periodicamente inspecionados, limpos e mantidos calibrados. Todo utensílio que tiver contato com as amostras deve ser autoclavado (vidraria) e, se possível, deve ser utilizado somente material descartável.

Outros cuidados sugeridos:

- Para diminuir o risco de contaminação na etapa de preparo, é recomendável a utilização do stomacher em relação ao mixer.
- No mix é desejável utilizar um controle negativo para verificar contaminação dos reagentes (tampão Buffer, dNTP, MgCl₂, DEPC e Taq DNA polimerase), visto ser de uso coletivo no Laboratório;
- Na eletroforese, é importante observar quando o brometo de etídio foi preparado e qual a freqüência de sua utilização no laboratório (quanto mais freqüentemente é utilizado, maior o tempo necessário para corar).

A capacitação técnica é fator fundamental, pois há grande quantidade de etapas e procedimentos. O técnico de laboratório deve ter cuidado para evitar qualquer contaminação do material (por qualquer outro tipo de DNA), possuir capacidade para avaliar os resultados e rastrear possíveis falhas.

Na padronização da PCR para a espécie canina, o limite mínimo de detecção foi de 10%. Algumas tentativas para reduzir esse limite foram realizadas, como: alteração da concentração de alguns reagentes do mix (o dobro da quantidade de Taq DNA polimerase e diminuição do volume de água DEPC), alteração no ciclo (mesma temperatura programada no termociclador para as espécies bovina e suína), mas não houve mudança no resultado.

No início da padronização, para as espécies bovina e suína o limite mínimo de detecção foi de 1% e 0,1%, respectivamente; após as tentativas para redução do limiar de detecção de canino houve alteração nos resultados de bovino e de suíno, correspondente há uma diluição seriada (10^{-1}) através da utilização de 0,25 μ L de Taq DNA polimerase. Os limites mínimos de detecção foram considerados satisfatórios.

Para estudos posteriores, recomendam-se algumas alterações no protocolo utilizado para espécie canina para obtenção de um melhor resultado ou até a mudança de primer. É provável que, numa fraude, a troca de uma espécie por outra, na matéria-prima ou produto final, seja maior que 10%. Porém é necessário alcançar um limite de detecção menor, como os alcançados nas espécies bovina e suína. Alguns autores como Calvo, Osta e Zaragoza (2001) e Calvo et al. (2002) acreditam que o valor deve ser o mais baixo possível; já Meyer, Candrian e Luth (1994) não consideram desejável um limite de detecção abaixo de 0,1% para alimentos, devido à detecção de contaminações.

Ainda em relação ao primer canino, foram notadas várias reações inespecíficas, com tamanhos de bandas variados, mas que não afetaram a interpretação dos resultados, visto serem bandas com tamanhos bem divergentes de 213 pb (figura 11).

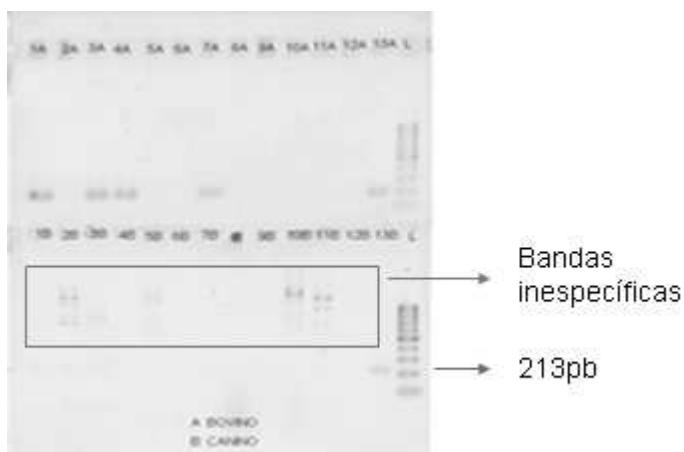


Figura 11 - Perfil das bandas no gel de agarose (bandas inespecíficas)

1 a 5. e 7 a 11. amostras COVISA; 6 e 12. Controle negativo (100% água DEPC); 13. Controle positivo (no caso: bovino e canino); L. Marcador de peso molecular

Em 4/53 amostras da COVISA (7,55%) apresentaram formação de banda para espécie bovina e suína. Uma das amostras (1,89%), sob lacre nº18704, existia a possibilidade de conter materiais de origem animal de espécies diferentes, por ser uma linguiça de fabricação caseira. As outras três amostras (5,66%) foram denominadas “contaminadas” porque apresentaram bandas de bovino e suíno, mas eram originárias de um único corte de carne (provenientes do mesmo restaurante). Para esse resultado, levantaram-se duas hipóteses: contaminação no estabelecimento de origem ou no Laboratório. A contaminação durante a coleta foi desconsiderada, pois houve orientação técnica de como proceder para evitá-la.

Para descartar uma possível contaminação no Laboratório, todo o processo foi repetido por três vezes desde as etapas iniciais (preparo da amostra, extração do DNA, amplificação e eletroforese). Na etapa de preparo foram utilizadas embalagens plásticas estéreis e houve a troca do equipamento de homogeneização (uso do stomacher). Não ocorreu alteração nos resultados.

Em relação à contaminação no estabelecimento de origem não houve interferência direta, visto que o presente estudo não previa tal ação, porém houve o acompanhamento de oito vistorias da COVISA em restaurantes do Bom Retiro (Anexo E).

A contaminação cruzada é uma irregularidade freqüente identificada nas vistorias da COVISA, relacionada aos equipamentos (ausência de separação entre grupos alimentares, higienização inadequada e presença de embalagens primárias

danificadas) e manipulação simultânea de carnes bovina, aves e lingüiça (SÃO PAULO, [2007]).

Em 6/53 amostras (11,32%) os resultados não foram conclusivos, devido à falta do primer específico. Em duas amostras (3,77%) foram relatadas como de espécie ovina e uma (1,89%) como carne de pato, durante as vistorias. Nas outras três amostras (5,66%) a espécie não foi informada. Durante o preparo das amostras para a extração observou-se semelhança macroscópica com carne de frango, peixe e avestruz, porém não foi possível concluir a identificação.

Não foi encontrado resultado confirmatório para carne de cão, nem nas 14/53 amostras (26,42%) provenientes dos restaurantes suspeitos coletadas pela COVISA, conforme reportagens dos dias 13 e 14 de novembro de 2009 (Anexo F). As amostras recolhidas pela 2^a Delegacia de Saúde Pública do Departamento de Polícia de Proteção à Cidadania (DPCC) não foram enviadas para análise.

O fato de não ter encontrado resultado positivo para a espécie canina, não descarta a hipótese de existir utilização de carne de cão para o consumo humano. É possível afirmar que dentre as amostras enviadas pela COVISA, durante a realização deste estudo, nenhuma delas foi identificada como canina. Vale lembrar, que as amostras foram colhidas aleatoriamente, nos dois restaurantes suspeitos.

Em 18/53 das amostras (33,96%) da COVISA recebidas, foram encontradas diferentes estruturas: 2/53 (3,77%) tripa, 11/53 (20,76%) osso, 1/53 (1,89%) casco, 2/53 (3,77%) osso /cartilagem e em 2/53 (3,77%) pele. Diluições variadas foram realizadas para conseguir detectar banda, pois havia a formação de um rastro. A diluição menor utilizada foi de 5% de amostra e 95% de água DEPC, para as tripas.

Como na padronização só foi utilizado músculo de membro posterior, é indicado padronizar novas espécies e também utilizar diferentes cortes e/ou apresentações diversas.

Durante a fase de preparo da amostra, foram testadas concentrações diferentes de carne com a solução tampão: 50g / 50mL, 40g / 60mL, 30g / 70mL e 20g / 80mL. O objetivo era conseguir um preparo adequado com a menor quantidade possível de amostra, para analisar quantidades mínimas de material encaminhado pela Vigilância Sanitária. A concentração utilizada, tanto na padronização, quanto nas amostras da COVISA, foi de 20g de amostra / 80mL de TE TRIS EDTA pH 8.0.

No levantamento dos custos, a proporção de 20g de amostra e 80mL de TE TRIS EDTA pH 8.0, demonstrou ser uma concentração de alto custo, responsável por

55,53% do custo total (R\$ 55,27). Para estudos posteriores, é recomendável utilizar mais amostra e reduzir a quantidade de tampão.

A maioria dos reagentes e soluções utilizadas tiveram custo muito baixo. Três soluções: TE TRIS EDTA pH 8.0, agarose a 1,5% e brometo de etídio representaram 84,57% do custo.

Para a solução de agarose a 1,5% é impossível reduzir o custo, pois tanto no processamento de 1 ou no de 10 amostras, é necessário o mesmo tamanho de placa (para 14 a 28 poços) e a mesma quantidade da solução. Já o brometo de etídio poderia ser utilizado diretamente na agarose, juntamente com a amostra na corrida da eletroforese, mas há risco (substância altamente tóxica e mutagênica).

Como a quantidade é indispensável nas duas soluções (30mL de agarose a 1,5% e 500mL de brometo de etídio) é recomendável processar uma maior quantidade de amostras por reação, para redução do custo por amostra. Essa simulação consta no quadro 8, ficando o custo de R\$ 21,15 por amostra.

Quadro 8 – Reagentes utilizados para PCR, com dez amostras e três controles (um positivo e dois negativos) - São Paulo - 2009

REAGENTES	QUANTIDADE UTILIZADA (QUA) ¹			CUSTO (CUM _a) ² OU (CUM _b) ³
	10 A	2 C-	1 C+	
TE TRIS EDTA pH 8.0	800mL	-	80mL	168,8016
Solução de GT	6000µL	1200µL	600µL	10,49935
Clorofórmio	1000µL	200µL	100µL	0,10478
Propanol	6000µL	1200µL	600µL	9,6369
Solução de Etanol a 70%	5000µL	1000µL	500µL	0,73996
Água destilada ultrapura	200µL	440 µL	20 µL	0,1254
Solução dNTP SET	40µL	8µL	4µL	1,70248
PCR dos primers forward Reverse	12,5µL 12,5µL	2,5µL 2,5µL	1,25µL 1,25µL	0,196 0,58784
Taq DNA polimerase	2,5µL	0,5µL	0,25µL	0,18837
Cloreto de magnésio	7,5µL	1,5µL	0,75µL	0,56511
Tampão Buffer	25µL	5µL	2,5µL	1,8837
DEPC	125µL	25µL	12,5µL	0,07263
Solução Agarose 1,5%		30mL		10,9995
Solução Brometo de etídio		500mL		5,04895
Solução 100BP DNA Ladder		3µL		0,31005
TOTAL (R\$)				211,46

¹ QUA: quantidade utilizada por amostra

² CUM_a: custo unitário médio da solução

³ CUM_b: custo unitário médio dos produtos p.a

A: amostra, C-: controle negativo, C+: controle positivo

Para mensuração do tempo total para realização da PCR não foram calculados tempos de espera maiores do que 10', como: - 20°C por 2h (mínimo), centrifugação por 20', secagem no termobloco por 15', amostras no termociclador 2h10', média de 30' para migração na eletroforese e média de 15' para corar no brometo de etídio. Estes tempos não computados totalizaram 5h30'.

Portanto, para obtenção dos resultados é necessário um tempo mínimo de 9h03'23" (valores contabilizados com uma amostra e dois controles, sem estimar qualquer contaminação ou etapa que necessitaria repetição).

Em relação ao custo final (R\$ 100,47) para identificação das três espécies, a maior parte 55,01% (R\$ 55,27) é representada pelos custos dos reagentes, ficando a mão de obra com 44,99% do custo (R\$ 45,20).

O único laboratório oficial que identifica a espécie (bovina e suína) no Estado de São Paulo, através de cromatografia gasosa e com limitações (necessidade do antissoro específico e proteína crua) cobra R\$80,00 por espécie.

A PCR demonstrou ser um recurso aplicável em todos os tipos de apresentação de carne (crua, cozida, congelada, processada, adicionada de outros ingredientes ou defumada), viável economicamente e útil para esclarecimento e tomada de decisões para a Vigilância Sanitária de Alimentos.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

- Foi possível padronizar a reação em cadeia pela polimerase para a identificação das espécies bovina, suína e cão, com os seguintes limites de detecção: 0,1%; 0,01% e 10%, respectivamente.
- É necessário aprimorar a técnica na identificação de cão e testar outros primers.
- Para a utilização da PCR para o controle de fraudes em alimentos é imprescindível padronizar outras espécies (ovino, felino, equino, pato, frango, avestruz, peixe), ampliando o espectro para permitir uma conclusão final sobre as amostras.
- O custo final para identificação das três espécies foi de R\$ 100,47, sendo R\$ 55,27 (55,01%) custos dos reagentes e R\$ 45,20 (44,99%) referente a mão de obra.
- O tempo médio para obtenção dos resultados contabilizados com uma amostra e dois controles (sem contaminação ou repetição de etapa) foi de 9h03'23".

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALLUCCELI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão de tuberculose e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.

ANDERSON, R. M.; DONNELLY, C. A.; FERGUSON, N. M.; WOOLHOUSE, M. E. J.; WATT, C. J.; UDY, H. J.; MAWHINNEY, S.; DUNSTAN, S. P.; SOUTHWOOD, T. R. E.; WILESMITH, J. W.; RYAN, J. B. M.; HOINVILLE, L. J.; HILLERTON, J. E.; AUSTIN, A. R.; WELLS, G. A. H. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. **Nature**, 382, 779-788, 1996.

ALVES, E. C. **Toxoplasma gondii**: soroprevalência, isolamento e virulência de cepas obtidas de galinhas caipiras (*Gallus domesticus*) comercializadas em feiras livres do município de Goiânia. 2007. 90 f. (Mestrado em Medicina tropical na área de concentração de parasitologia) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

AZEVEDO, P. F. ; BANKUTI, F. I. Na Clandestinidade: o mercado informal da carne bovina. In: INTERNACIONAL CONFERENCE ON AGRI-FOOD CHAIN/NETWORKS ECONOMICS AND MANAGEMENT, 3., 2001, Ribeirão Preto. **Anais...**, v. 1, p. 1-12.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei nº 30.691, de 29 de março de 1952 – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Estabelece as normas que regulam em todo território nacional, a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro: 7 jul.1952. Sec. 1, pt.10785.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 5, de 08 de novembro de 1988. Aprova a Padronização dos Cortes de Carne Bovina, proposta pela Divisão de Padronização e Classificação de Produtos de Origem Animal (DIPAC). **Diário Oficial da União**, Brasília: 18 nov. 1988. Sec. 1, pt. 22291.

BRASIL. Ministério da Justiça. Decreto-Lei nº 2.848, de 07 de dezembro de 1940. Código Penal do Brasil. Estabelece o código penal brasileiro. **Diário Oficial da União**, Rio de Janeiro: 31 dez.1940. Sec. 1 , pt. 2391.

BRASIL. Ministério da Justiça. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990 – Código de defesa do Consumidor. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: 13 set. 1990b, Sec. 1, pt. 176

BRASIL. Ministério da Justiça. Lei nº 8.137, de 27 de dezembro de 1990. Define crimes contra a ordem tributária, econômica e contra as relações de consumo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: 28 dez. 1990, 1990a, Sec. 1, pt. 25534

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lei Federal nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 – Lei Contra Crimes Ambientais. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília: 13 fev. 1998. Sec. 1, pt. 25

BRASIL. Receita Federal. Atos Declaratórios. Atos Declaratórios Cosit. Valor do dólar para fins fiscais. Brasil, [2009]. Disponível em: <<http://www.receita.fazenda.gov.br/legislação/legisassunto/cotadolar.htm>>. Acesso em 30 de novembro de 2009.

BUSO, G. **Análise do perfil do consumidor de carne bovina na cidade de São Paulo**. 2000. 174 f. (Mestrado em Administração) - Departamento de Engenharia de Produção, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2000.

CALDWELL, J. M.; RALEY, M. E.; LEVINE, J. F. Mitochondrial Multiplex Real-Time PCR as a Source Tracking Method in Fecal-Contaminated Effluents. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 9, p. 3277-3283, 2007.

CALVO, J. H.; OSTA, R.; ZARAGOZA, P. Quantitative PCR detection of pork in raw and heated ground beef and pâté. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5265-5267, Sep. 2002.

CALVO, J. H.; RODELLAR, C.; ZARAGOSA, P.; OSTA, R. Beef-and bovine- derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5262-5264, 2002.

CALVO, J. H.; ZARAGOZA, P.; OSTA, R. Technical note: a quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 8, p. 2108-12, Aug. 2001.

CARRIERI, M. L.; TAKAOKA, N. Y.; KOTAIT, I.; GERMANO, P. M. L. Diagnóstico clínico-epidemiológico da raiva humana: dados do Instituto Pasteur de São Paulo do período de 1970-2002. **Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA)**, v. 29, n. 3, Maio 2006. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa29_raiva.htm>. Acesso em: 17 jan. 2008.

CARVALHO, M. S.; BARROSO, M. R.; PINHAL, F.; TAVARES, F. M. Brucelose: alguns aspectos epidemiológicos. **Medicina Interna**, v. 2, n. 4, p. 259-261, 1995.

CAWTHRAW, S.; SAUNDERS, G. C.; MARTIN, T. C.; SAWYER, J.; WINDL, O. REANEY, S. D. Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1055-62, May 2009.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES/SP. **Manual das doenças transmitidas por alimento e água**. São Paulo, [2002a]. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/BRUCELOSE.htm>>. Acesso em: 17 jan. 2008.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – SES/SP. **Manual das doenças transmitidas por alimento e água**. São Paulo, [2002b]. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Toxoplasma_gondii.htm>. Acesso em: 17 jan. 2008.

CHEN, F-C; HSIEH, Y-H. PEGGY. Detection of pork in heat-processed meat products by monoclonal antibody-based ELISA. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 1, p. 79-85, 2000.

CHOMCZINSKY, P. A. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and protein from the cell and tissues samples. **Biotechniques**, v.15, p. 532-537. 1993.

DALMASSO, A.; FONTANELLA, E.; PIATTI, P.; CIVERA, T.; ROSATI, S.; BOTTERO, M. T. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, n. 2, p. 81-87, 2004.

DONE, S. H.; GOODY, P. C.; EVANS, S. A; STICKLAND, N. C. **Atlas colorido de anatomia veterinária do cão e do gato**. São Paulo: Manole, 2002. v. 3.

FAJARDO, V.; GONZÁLEZ, I.; LÓPES-CALLEJA, I.; MARTÍN, I.; ROJAS, M.; GARCÍA, T.; HERNANDÉZ, P. E.; MARTÍN, R. PCR identification of meta from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean bies (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial D-loop region. **Meat Science**, v. 76, p. 644-652, 2007.

FISCHLER, C. Classification second les culture (mangeable pas de mangeable) de sûr espèce animaux. **L'homnivore**. Paris: Poche Odile Jacob, 2001. p. 28.

FREITAS, G. P. C. de. **Contribuição para o estudo do custo unitário das análises laboratoriais e sua comparação com a tabela de procedimentos da Associação Médica Brasileira - AMB 92, em um laboratório de pequeno porte.** 2005. 186 f. (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FREITAS, J. A.; GALINDO, G. A. R.; SANTOS, E. J. C.; SARRAF, K. A.; OLIVEIRA, J. P. Risco de brucelose zoonótica associado a suínos de abate clandestino. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 1, p. 101-102, 2001.

FREITAS, J. A.; GALINDO, G. A. R.; SARRAF, K. A.; OLIVEIRA, J. P. Situação atual e aspectos higiênicos e sanitários do abate clandestino, na região metropolitana de Belém, Pará. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 143, p. 45-49, Ago 2006.

GAO, H. W.; XU, B. L.; LING, C. Z.; ZHANG, Y. B; ZHU, L. H. Polymerase Chain Reaction method to detect canis materials by amplification of species-specific DNA fragment. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 5, p. 1195-1199, 2004.

GARFIELD, F. M.; KLESTA, E.; HIRSCH, J. **Quality assurance principles for analytical laboratories**. Arlington: Association of Official Analytical Chemistry International; 1994. p. 220.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de Toxinfecções. In: **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varella, 2003, p. 215-275.

GERTH, E. R. **Análise de custos na comparação dos métodos laboratoriais para avaliação da resistência do Mycobacterium tuberculosis**. 2001. 58 f. (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GIOVANNACCI, I.; GUIZARD, C.; CARLIER, M.; DUVAL, V.; MARTIN, J. L.; DEMEULEMESTER, C. Species identification of meat products by ELISA. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 8, p. 863-867, 2004.

GIRISH, P. S.; ANIANEYULU, A. S.; VISWAS, K. N.; SANTHOSH, F. H.; BHILEGAONKAR, K. N.; AGARWAL, R. K.; KONDAJAH, N.; NAGAPPA, K. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism of mitochondrial 12S rRNA gene: a simple method for identification of poultry meat species. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 4, p. 447-55, May 2007.

GONÇALVES, D. D.; TELES, P. S.; REIS, C. R.; LOPES, F. M. R.; FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; ALVES, L. A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Soroepidemiologia e variáveis ocupacionais e ambientais relacionadas à leptospirose, brucelose e toxoplasmose em trabalhadores de frigorífico do Estado do Paraná, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 135-140, 2006.

JANSEN, F. W.; HÄGELE, G. H.; BUNTJER, J. B.; LENSTRA, J. A. Species identification in meat by using PCR-generated satellite probes. **Journal of Industrial & Biotechnology**, v. 21, n. 6 , p. 115-120, 1998.

LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384 p.

LIMA, M. M. L. **Contribuição para o estudo dos custos em laboratórios de saúde pública do estado de São Paulo**. 2007. 142 f. (Mestrado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LÓPEZ-ANDREO, M.; LUGO, L.; GARRIDO-PERTIERRA, A.; PRIETO, M. I.; PUYET, A. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 339, p. 73-82, 2005.

LOSSIO, M. N.; FERRANDO, M. L.; DAMINELLI, P.; CHEGDANI, F. Setting up a PCR based method to trace animal species in processed meat products. **Veterinary Research Communications**, v. 28, n. 1, p. 253-255, 2004.

MACIEL, B. M.; FILHO, R. C. A.; FREITAS, E. S.; KRUSCHEWSKY, F. F.; SANTOS, B. F.; ROCHA, G. D.; WETLER, R. M. C., MARTINS, L. A. F. Ocorrência de sorotipos exóticos de *Salmonella* encontrados em cães assintomáticos nos distritos do município de Ilhéus / BA – Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 247-253, 2004.

MACIEL, M. E. Cultura e Alimentação ou o que têm a ver macaquinhas de Koshima com Brillat-Savarin? **Horizontes Antropológicos**, v. 7, n. 16, p. 145-156, Dez. 2001.

MARTINS, E. A. **Contabilidade de custos**. 9. ed. São Paulo: Atlas, 2003. 370 p.

MEYER, M. J.; FRIEDMAN, S. L.; FARRELL, D. E.; DOVE-PETTIT, D. A.; BUCKER, M. F.; KELLY, S.; MADZO, S.; CAMPBELL, W.; WANG, R.; PAINE, D.; CERNIGLIA, C. E. Validation of a polymerase chain reation method for the detection of rendered bovine-derived materials in feedstuffs. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 4, p. 564-566, 2001.

MEYER, R.; CANDRIAN, U. PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel Wissenchard Und Technology**, v. 29, n. 1 , p. 1-9, 1996.

MEYER, R.; CANDRIAN, U.; LÜTH, J. Detection of pork in heated meat products by the polymerase chain reaction. **Journal of AOAC International**., v. 77, n. 3 , p. 617-622, 1994.

PARDI, M. C.; DOS SANTOS, F.; DE SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2.ed. Goiânia: Editora UFG, 2006, v. 1, p. 43, 613-616.

POPESKO, P. **Atlas de anatomia topográfica dos animais domésticos**. São Paulo: Manole, 1997. v. 3, 205 p.

RODRIGUEZ, M. A.; GARCIA, T.; GONZALEZ, I.; ASENSIO, L.; MAYORAL, B.; LOPEZ-CALLEJA, I.; HERNANDEZ, P. E.; MARTIN, R. Identification of goose, mule, duck, chicken, turkey, and swine in foie gras by species-specific polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1524-1529, 2003.

RODRIGUEZ, M. A.; GARCIA, T.; GONZALEZ, I.; ASESENSIO, L.; HERNANDEZ, P. E.; MARTÍN, R. PCR identification of beef, sheep, goat, and pork in raw and heat-treated meat mixtures. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 1, p. 172-177, 2004.

SANNAZZARO, C. A. C. **Contribuição para o estudo dos custos unitários de análises bioquímicas quantitativas realizadas pelo processo manual e pelo processo automático no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário**. 1993. 216 f. (Doutorado em Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Municipal da Saúde. Coordenadoria Vigilância à Saúde. **Estudo das irregularidades mais frequentes em estabelecimentos que comercializam alimentos na cidade de São Paulo.** São Paulo, [2007]. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/saude/vigilancia_em_saude/vigilancia_sanitaria/alimentos/index.php?p=7082>. Acesso em: 30 de nov. de 2009.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Municipal da Saúde. Instituto Adolfo Lutz. Laboartório de Saúde Pública. **Tabela de preços fediais – Divisão de bromatologia e química.** São Paulo, [2010]. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=12. Acesso em: 10 de jan. de 2010.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Municipal da Saúde. Portaria nº1210 de 02 de agosto de 2006. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas, que estabelece os critérios e parâmetros para a produção/fabricação, importação, manipulação, fracionamento, armazenamento, distribuição, venda para o consumo final e transporte de alimentos e bebidas. Secretaria Municipal de Saúde – São Paulo. **Diário Oficial da Cidade de São Paulo**, São Paulo, 3 ago 06, n. 146, pg. 21.

SHINODA, N.; KUSAMA, T.; YOSHIDA, T.; SUGIURA, T.; KADOWAKI, K.; ONODERA, T.; SUGIURA, K. Developing PCR primers using a new computer program for detection of multiple animal-derived materials in feed. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 11, p. 2257-2262, 2008.

SILVA, A. M.; BARBOSA, S. F. C.; ALKIMIN, M. G. A.; VAZ, A. J.; SHIMOKOMAKI, M.; TENURA, A. Hamburger meat identification by dot-ELISA. **Meat Science**, v. 56, n. 2, p. 189-192, 2000.

STROBEL, J.; HASTREITER, S. T.; DEGASPARI, C. H.; BAPTISTA, P. P. Hábitos de consumo alimentar dos Curitibanos. **Revista Visão**, v. 6, n. 2, p. 24-37, 2005.

TANABE, S.; HASE, M.; YANO, T.; SATO, M.; FUJIMURA, T.; AKIYAMA, H. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 12, p. 3131-3135, Dec. 2007.

TAO, XIAO YAN; TANG, QING; LI, HAO; MO, ZHAO-JUN; ZHANG, HONG; WANG, DING-MING; ZHANG, QIANG.; SONG, MIAO.; VELASCO-VILLA, ANDRES; WU, XIANFU.; RUPPRECHT, CHARLES E.; LIANG, G-D. Molecular Epidemiology of Rabies in Southern People's Republic of China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 1192-1198, Aug. 2009.

TARTAGLIA, M.; SAULLE, E.; PESTALOZZA, S.; MORELLI, L.; ANTONUCCI, G.; BATTAGLIA, P. A. Detection of Bovine Mitochondrial DNA in Ruminant Feeds: A Molecular Approach to Test for the Presence of Bovine-Derived Materials. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 5, p. 513-518, 1998.

TELETCHEA, F.; MAUDET, C.; HANNI, C. Food and Forensic molecular identification: update and challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 359-366, 2005.

TOGINHO FILHO, D. O.; ANDRELLO, A. C. **Catálogo de experimentos do laboratório integrado de física geral**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, [2009]. Disponível em: <http://www.uel.br/cce/fisica/docentes/dari/d3_material10_6ce2c61b.pdf>. Acesso em: 20 de nov. 2009.

TOOROP, R. M.; MURCH, S. J.; BALL, R. O. Methodology and development of prediction equations for the determination of pork substitution in veal. **Food Research International**, v. 30, p. 629-636, 1997.

TOYODA, A.; NAKAJO, M.; KAWACHI, H.; MATSUI, T.; YANO, H. PCR detection of bovine mitochondrial DNA derived from meat and bone meal in feed. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2829-2832, 2004.

UNGAR, M. L.; GERMANO, P. M. L. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo (Brasil). **Revista Saúde Pública**, v. 26, n. 3, p. 167-172, 1992.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Departamento de Recursos Humanos (DRH). **Tabela de vencimento de funcionários**. São Paulo, [2009]. Disponível em: http://www.usp.br/drh/novo/carreiras/tabsalfunc05_2009.html. Acesso em: 21 set. 2009.

VALLEJO, B.; GONZÁLEZ, A. F.; MAZORRA, M. A.; RODRÍGUEZ, R. Capillary eletrophoresis for the analysis of meat authenticity. **Food of Separation Science**, v. 28, p. 826-836, 2005.

VELOSO, A. C. A.; TEIXEIRA, N.; FERREIRA, I. M.P.L.V.O. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. **Química Nova**, v. 25, n. 4, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000400016&lng=en&nrm=iso>. Acesso: 03 mar. 2009.

WANG, Z. Q.; CUI, J. Outbreaks of human trichinellosis caused by consumption of dog meat in China. **Parasite**, v. 8, n.2, p. 74-77, 2001.

YOSHIDA, T.; NOMURA, T.; SHINODA, N., KUSAMA, T.; KADOWAKI, K.; SUGIURA, K. Development of PCR primers for the detection of porcine DNA in feed using mtATP6 as the target sequence. **Journal of the food Hygienic Society of Japan**, v. 50, n. 2, p. 89-92, 2009.

ZENG, SHAO LING.; QIN, Z.; RUAN, Z.; HUA, Q.; LU, T.; LU, J.; CHEN, S.; CAO, C.; ZHANG, C.; SUN, J.; CHEN, B.; WU, S. Multiplex fluorescent real-time PCR detection of bovine, goat and sheep derived materials in animal products. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 139-146, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Planilha de coleta de amostras

Data: ____ / ____ / ____	Amostra nº: _____
Local da Coleta:	
Amostras: <input type="checkbox"/> CRUA <input type="checkbox"/> COZIDA <input type="checkbox"/> TEMPERADA	
Observações:.....	
Acondicionamento: <input type="checkbox"/> REFRIGERADA <input type="checkbox"/> CONGELADA <input type="checkbox"/> TEMPERATURA AMBIENTE	
Observações:.....	
USO FMVZ/USP:	
Aspecto:	
Data de recebimento: ____ / ____ / ____	
Data de processamento: ____ / ____ / ____	
Resultado:	
Observações:	

APÊNDICE B – Laudo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”

LAUDO

Nº do Termo de coleta de amostra COVISA	Laudo de análise n°...../.....
Produto descrito como.....	
Amostra: <input type="checkbox"/> crua <input type="checkbox"/> cozida <input type="checkbox"/> temperada <input type="checkbox"/> refrigerada <input type="checkbox"/> congelada <input type="checkbox"/> em temperatura ambiente	
Data de fabricação e validade..... Data da coleta/...../..... Lacre n°.....	
Acondicionamento da amostra.....	
Estabelecimento: Nome..... Logradouro.....	
Características macroscópicas.....	
Data de recebimento:/...../..... Data de processamento:/...../..... e/...../.....	
Resultado da PCR	
Observações.....	

São Paulo, ____ de _____ de _____

Fernanda de Melo Lima Brugnano
Médica Veterinária / Pós-graduanda FMVZ/USP

Simone de Carvalho Balian
Profa. Dra. FMVZ/USP



DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E SAÚDE ANIMAL-VPS

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - Cidade Universitária / SP – CEP. 05508-270

Fone: (11) 3091-7653/ 3091-7930 - Fax (11) 3091-7928

APENDICE C - Especificações de reagentes

Tabela 3 – Especificações de reagentes utilizados na PCR para identificação da espécie - São Paulo - 2009

REAGENTES	UNID ADE	QTDE	ESPECIFC. (QpT)
Tiocianato de Guanidina	fr.	1	500g
Tris base	fr.	1	100g
Tris HCl	fr.	1	100g
EDTA sal dissódico (Na ₂ EDTA)	fr.	1	100g
Fenol	fr.	1	100mL
Hidróxido de sódio	fr.	1	250g
Glicogênio	fr.	1	100µL
Clorofórmio p.a.	L	1	1000mL
Propanol p.a.	L	1	1000mL
Etanol p.a.	L	1	1000mL
Acido Bórico	fr.	1	500g
Água destilada	fr.	1	1000mL
Água destilada ultrapura (livre de DNase e RNase)	fr.	1	1000mL
Água DEPC (dietfílico carbonato)	L	1	1000mL
dNTP SET (100mM): dATP, dCTP, dGTP, dTTP	fr.	1	0,25mL ou 250µL cd
Primers (f/r) Bovino	fr.	1 par	31,6nmol e 36,3nmol
Primers (f/r) Suíno	fr.	1 par	34,1nmol e 35,3nmol
Primers (f/r) Canino	fr.	1 par	23,7nmol e 36,4nmol
Taq DNA polimerase (500U) / Cloreto de magnésio (50mM) / Tampão Buffer 10X PCR	fr.	1 kit	100µL / 1mL / 2,5mL (3600 µL)
Agarose para eletroforese	fr.	1	100g
Brometo de etídio	fr.	1	30mL
100BP DNA Ladder / Corante 6 X Loading	fr.	1 kit	1050µL (50µL / 1mL)

* valores expressos em reais (R\$)

QpT: quantidade do produto total

ANEXO A – Modo de preparo das soluções

Solução de TE TRIS EDTA pH 8.0:

- 5mL TRIS HCl 1M (121,1g TRIS HCl + 800mL água destilada) ,
- 1mL Na₂ EDTA 0,5M pH 8.0 (186,1g Na₂ EDTA + 800mL água destilada + 20g de NaOH para ajustedo pH).
- 494mL de água destilada

Solução de IsoTiocianato de guanidina 5M/ Fenol pH 7,5:

Etapa 1:

- 60g GT (Isotiocianato de guanidina) ,
- 5 mL TRIS-HCl 1M pH 7,5,
- 10mL EDTA 0,25M pH 8,0,
- água destilada qsp 100 mL.

Agitador aquecido por 30 minutos.

Etapa 2:

Produto da etapa 1 + 100 mL de fenol pH 7,5. Agitador em temperatura ambiente.

Etapa 3: 20µL de glicogênio (1,4mg).

Aguardar 24 horas. Armazenamento sob refrigeração.

Solução de DNTP 10mM:

- 10µL de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP),
- 60µL de água destilada.

Tampão TBE 10X:

- 10,8g de TRIS Base
- 5,5g de Ácido bórico
- 0,83g de Na₂ EDTA
- 500mL deágua destilada

Misturar com agitador magnético, até dissolver completamente, filtrar a solução através de uma membrana ≤ 0.45µm utilizando bomba à vácuo. Medir o pH (8,2 – 8,6) e armazenar em temperatura ambiente).

Solução de Agarose 1,5% (Grau técnico genético):

- 1,5g de agarose
- 100mL de TBE 0,5X

Dissolver a garose no TBE em banho-maria ou microondas (sob monitoramento) até ficar translúcido.

Solução de Marcador de peso molecular (Ladder)

- 10µL de Ladder
- 10µL de 6X DNA Loading Dye
- 40µL de água destilada.

Solução de Brometo de etídio

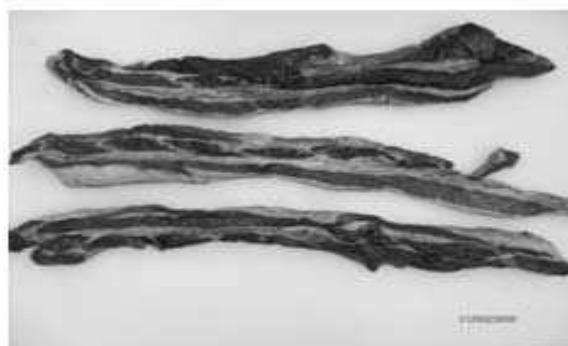
- 25µL de brometo de etídio
- 500mL de água destilada.

ANEXO B – Fotos de algumas amostras encaminhas pela COVISA**Figura 12 – Tripas**

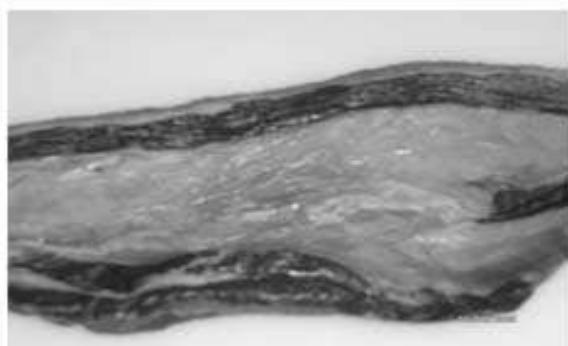
Lacre: 15756



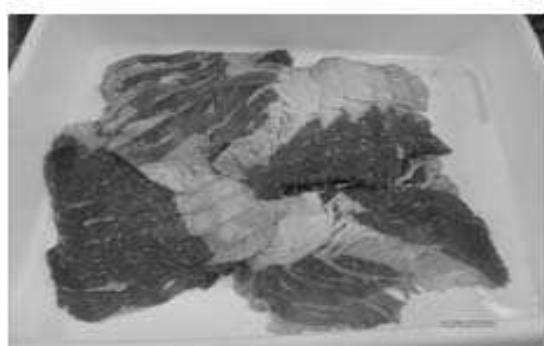
Lacre: 18703

Figura 13 – Carnes defumadas

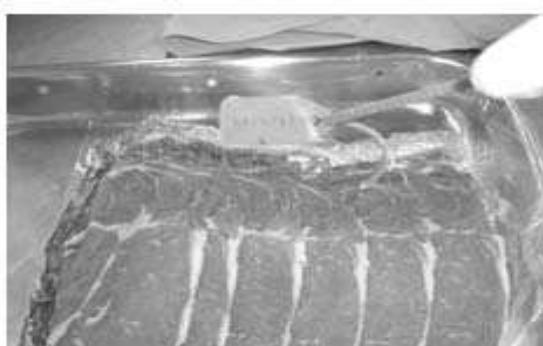
Lacre: 10499



Lacre: 10501

Figura 14 – Carnes tipo “carpaccio”

Lacre: 18702



Lacre: 15753

Figura 15 – Lingüiça de fabricação caseira



Lacre: 18704

Figura 16 – Carne com gordura, cartilagem, casco, crua, refrigerada



Lacre: 15744

Figura 17 – Presença de várias apresentações



Lacre: 18710

Figura 18 – Carne previamente moída



Lacre: 17425

Figura 19 – Carnes com osso, cruas, refrigeradas e sem tempero



Lacre: 18083

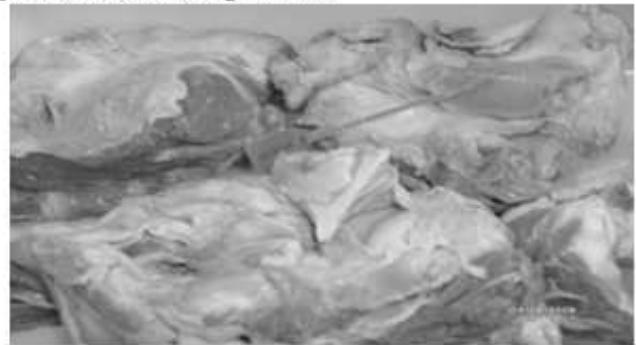


Lacre: 19813

Figura 20 – Carnes com osso, gordura, cartilagem, cruas e refrigeradas



Lacre: 15757



Lacre: 15745

Figura 21 – Carnes desconhecidas macroscopicamente



Lacre: 7312



Lacre: 7309

ANEXO C – Descrição das atividades do técnico de Laboratório IA

Quadro 9 – Plano de classificação de funções do grupo técnico da Universidade de São Paulo, aprovado pelo CCRH em 08.06.2009 - São Paulo - 2009

TÉCNICO DE LABORATÓRIO	TÉCNICO DE LABORATÓRIO II	TÉCNICO DE LABORATÓRIO III
FAIXA: (Início: IA Fim: IK) Código: 680	FAIXA: (Início: IIA Fim: IIK) Código: 1123	FAIXA: (Início: IIIA Fim: IIIK) Código: 1124
Descrição: Sumária: Desenvolver e executar atividades de apoio técnico, destinados ao ensino, pesquisa e extensão. Detalhada: <ul style="list-style-type: none"> Colaborar, com profissionais da área e docentes, no planejamento e execução de experimentos destinados ao ensino, pesquisa, extensão e prestação de serviços, dentro do campo da ciência em que estiver envolvido. Preparar, instalar, manipular, controlar, armazenar materiais e equipamentos próprios de laboratório, bem como conhecer e manipular reagentes, solventes, equipamentos, ferramentas e instrumentos manuais, mecânicos, elétricos e eletrônicos, necessários para o desenvolvimento do trabalho. Auxiliar, sob orientação de docentes ou técnicos de nível superior, na padronização e desenvolvimento de técnicas laboratoriais, colaborando na análise de resultados e preparação de relatórios. Preparar pacientes e realizar exames dependendo da área de atuação. Preparar solicitações de compras, organizar e controlar o almoxarifado da área de atuação. Auxiliar nas atividades de apoio à pesquisa, extensão e saúde, executando os procedimentos requeridos para o desenvolvimento dos trabalhos, colaborando nas aferições dos resultados das análises. Auxiliar docentes nas atividades de ensino, prestando materiais e equipamentos necessários para aulas (práticas e teóricas), fazendo acompanhamento nas aulas práticas laboratoriais. Regular, controlar e operar os aparelhos de acordo com os tipos de testes solicitados, adequando-os aos objetivos do trabalho. Executar o tratamento e descarte de resíduos e solventes, defensivos, com base em normas padronizadas de segurança ou métodos e técnicas indicadas por profissionais da área. Executar ou promover, conforme o caso, atividades de manutenção preventiva e corretiva, necessárias à conservação de equipamentos, instrumentos e outros materiais da área de atuação. Receber, coletar, preparar, examinar e distribuir materiais, efetuando os testes necessários, procedendo aos registros, cálculos e demais procedimentos pertinentes, para subsidiar os trabalhos. Preparar e utilizar soluções, amostras, substratos, reagentes, solventes, empregando aparelhagem e técnicas, de acordo com a determinação dos profissionais da área de atuação. Realizar análise de materiais e substâncias em geral, utilizando métodos específicos para cada caso, observando e efetuando a leitura dos resultados obtidos. Em procedimentos experimentais, registrar os dados observados. 	Descrição: Além do conhecimento e desenvolvimento das atividades da faixa I, o funcionário deve: <ul style="list-style-type: none"> Purificar solventes especiais e reagentes que exigam tratamento químico para eliminação de impurezas. Preparar, montar o material e equipamentos empregados em experimentações animais, em operações que requerem conhecimentos especializados na área. Realizar acasalamentos programados e sacrificar animais conforme normas específicas de eutanásia. Auxiliar no treinamento dos funcionários da faixa I do grupo Técnico e os do Grupo Básico. Orientar os serviços dos técnicos da faixa I de sua área de atuação. 	Descrição: Além do conhecimento e desenvolvimento das atividades das faixas I e II, o funcionário deve: <ul style="list-style-type: none"> Colaborar com os técnicos do grupo superior na elaboração de relatórios dos seus setores de atuação. Supervisionar e executar tarefas de maior complexidade que envolvam conhecimentos especializados na área. Auxiliar pesquisadores nas práticas de procedimentos técnicos com animais de laboratório. Participar sob orientação de cursos para formação dos recursos humanos visando simplificar e aumentar a eficiácia das atividades funcionais. Contatar as oficinas de manutenção e participar de projetos de expansão, modernização, adaptação e reforma de laboratórios, acompanhando os serviços. Realizar sob orientação treinamentos de técnicos das faixas I e II e dos básicos de sua área de atuação.

PLANO DE CLASSIFICAÇÃO DE FUNÇÕES			GRUPO: TÉCNICO
TÉCNICO DE LABORATÓRIO	TÉCNICO DE LABORATÓRIO II	TÉCNICO DE LABORATÓRIO III	
FAIXA: (Início: IA Fim: IK) Código: 680	FAIXA: (Início: IIA Fim: IIK) Código: 1123	FAIXA: (Início: IIIA Fim: IIIK) Código: 1124	
Descrição: <ul style="list-style-type: none"> Efetuar preservação das peças anatômicas e órgãos, mantendo-as em soluções específicas, para serem utilizadas em aulas práticas e estudos científicos. Preparar peças anatômicas e órgãos para o desenvolvimento de aulas práticas, retirando-as dos arquivos e colocando-as à disposição dos docentes e alunos. Elaborar relatórios das atividades desenvolvidas, abrangendo os métodos, materiais, equipamentos e resultados alcançados. Participar da elaboração de manuais de procedimentos para operação de instrumentos e execução de técnicas laboratoriais e de experimentos. Auxiliar na organização de arquivos, envio e recebimento de documentos, pertinentes a sua área de atuação para assegurar a pronta localização de dados. Desenvolver suas atividades utilizando normas e procedimentos de biossegurança e/ou segurança do trabalho. Zelar pela guarda, conservação, manutenção e limpeza dos equipamentos, instrumentos e materiais utilizados, bem como do local de trabalho. Mantê-lo atualizado em relação às tendências e inovações tecnológicas de sua área de atuação e das necessidades do setor/departamento. Executar outras tarefas correlatas, conforme necessidade ou a critério de seu superior. 	Descrição:	Descrição:	

ANEXO D – Vencimento de funcionários da Universidade de São Paulo

Quadro 10 – Vencimento de funcionários da Universidade de São Paulo, atualizada em 22 de junho de 2009 - São Paulo - 2009

Tabela de Vencimento - Funcionários

Validade : A partir de Maio/2009

Classe	Nível/ Faixa	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
BÁSICO	I							1.136,24	1.193,05	1.252,70	1.315,34	1.381,11
BÁSICO	II	1.136,24	1.193,05	1.252,70	1.315,34	1.381,11	1.450,17	1.522,68	1.598,81	1.678,75	1.762,69	1.850,82
BÁSICO	III	1.450,17	1.522,68	1.598,81	1.678,75	1.762,69	1.850,82	1.943,36	2.040,53	2.142,56	2.249,69	2.362,17
TÉCNICO	I	1.678,75	1.762,69	1.850,82	1.943,36	2.040,53	2.142,56	2.249,69	2.362,17	2.480,28	2.604,29	2.734,50
TÉCNICO	II	2.249,69	2.362,17	2.480,28	2.604,29	2.734,50	2.871,23	3.014,79	3.165,53	3.323,81	3.490,00	3.664,50
TÉCNICO	III	2.871,23	3.014,79	3.165,53	3.323,81	3.490,00	3.664,50	3.847,73	4.040,12	4.242,13	4.454,24	4.676,95
SUPERIOR	I	3.323,81	3.490,00	3.664,50	3.847,73	4.040,12	4.242,13	4.454,24	4.676,95	4.910,80	5.156,34	5.414,16
SUPERIOR	II	4.242,13	4.454,24	4.676,95	4.910,80	5.156,34	5.414,16	5.684,87	5.969,11	6.267,57	6.580,95	6.910,00
SUPERIOR	III	5.156,34	5.414,16	5.684,87	5.969,11	6.267,57	6.580,95	6.910,00	7.255,50	7.618,28	7.999,19	8.399,15

Fonte: DRH/USP (SÃO PAULO, [2009]).

ANEXO E – Acompanhamento de vistorias da COVISA

Apontamentos de acordo com a Portaria 1210/06 - Estabelece os requisitos essenciais de boas práticas na produção de alimentos, a fim de subsidiar as ações da Vigilância Sanitária, estabelecendo os critérios de higiene, as boas práticas de fabricação e prestação de serviços, e os procedimentos operacionais padronizados para alimentos, visando prevenir e proteger a saúde do consumidor, a saúde do trabalhador e, ainda, preservar o meio ambiente (São Paulo, 2006).

Figura 22 – Falha na higienização



Art. 8.3. - As empresas deverão manter a organização, a limpeza e a desinfecção dos equipamentos, dos utensílios e do ambiente em todas as dependências, internas e externas. Art. 17.2.1. - Os equipamentos e utensílios devem ser higienizados antes e após o uso.

Figura 23 – Utensílios com sinais de ferrugem e sujidades



Art. 9.11. - Os utensílios devem ser em quantidade suficiente, construídos com material sanitário, devem ser mantidos bem conservados, livres de ponto escuro, furo, amassamento, limpos, protegidos de sujidades, de insetos e de pragas.

Figura 24 – Presença de produtos impróprios na área de manipulação



Art. 11, VIII - todo material de limpeza, higiene, perfumaria e material químico deve ser armazenado separadamente dos alimentos e Art. 13.1.7. - É proibida a colocação de caixas de madeira e de papelão dentro da área de preparo.

Figura 25 – Presença de alimentos no chão (câmara fria e área de manipulação)



Art. 11.1. - Os alimentos devem ser armazenados de forma organizada, em local limpo, livre de pragas e atender os seguintes critérios: II - dispostos longe do piso, sobre estrados fixos ou móveis.

Figura 26 – Alimentos abertos dentro do refrigerador e sem qualquer identificação



Art. 11.6.2. - Os alimentos preparados e os pratos prontos para o consumo elaborados em cozinhas industriais, restaurantes, lanchonetes e similares, devem ser acondicionados em recipientes de material liso, impermeável, devidamente protegidos e identificados com nome do produto e validade e Art. 12.7.1. - Os alimentos devem ser porcionados com utensílios próprios, que devem ser removidos e lavados após sua utilização.

Figura 27 – Área de manipulação inadequada
(ambiente aberto e com presença de bicicleta pendurada).



Art. 8.7. - Não é permitida a permanência de materiais e equipamentos em desuso e/ou estranhos à atividade. (São Paulo, 2006).

Figura 28 – Prateleira inadequada e presença de produto de limpeza
(área de manipulação)



Art. 9.10. - As mesas, bancadas, prateleiras, pias, cubas, tanques, devem ser suficientes e feitas de material sanitário (material inerte que não favorece a migração de elementos para o alimento, não poroso, desenhado de forma a não permitir o refúgio de pragas e microrganismos e outras contaminações devendo, ainda, facilitar a sua limpeza e desinfecção), liso, resistente e impermeável, bem conservado e Art. 11, VIII - todo material de limpeza, higiene, perfumaria e material químico deve ser armazenado separadamente dos alimentos.

Figura 29 – Restos alimentares do dia anterior e presença de praga



Art. 16.1. - O programa de controle de pragas deve contemplar todas as medidas preventivas necessárias para minimizar a necessidade da aplicação de desinfestantes domissanitários.

Figura 30 – Riscos ao trabalhador



Art. 20.18.1. - Não deverá existir, dentro das áreas de produção de alimentos, caixa de esgoto, Art. 20.10 - As instalações elétricas devem ser embutidas e Art. 3 - As boas práticas devem ser específicas para cada atividade desenvolvida, de acordo com as seguintes diretrizes: b. controle de situações de risco à saúde do empregado e c. controle de situações de risco ao meio ambiente.

ANEXO F – Reportagens sobre abate clandestino de cães – nov. 2009

FOLHA DE S.PAULO
SEXTA-FEIRA, 13 DE NOVEMBRO DE 2009 * C1

ABATEDOURO DE CÃES E GATOS Os clientes da carne eram restaurantes coreanos localizados no bairro do Bom Retiro

Como funcionava o esquema

O preço de cada animal variava de R\$ 180 até R\$ 220

Fonte: Polícia Civil

Endereço: Estrada São Paulo - Suzano
Cidade: Miguel Badra
Av. Miguel Badra, 3.039

Polícia fecha matadouro de cães e gatos

Casal de Suzano, na Grande SP, foi preso sob suspeita de matar os animais e vendê-los para restaurantes coreanos do Bom Retiro

Legislação brasileira proíbe a comercialização desse tipo de produto, que era vendido por até R\$ 220, de acordo com a polícia

ANNA CAROLINA CARDOSO COLABORAÇÃO PARA A FOLHA AFONSO BENITES DA REPARTIÇÃO LOCAL

Uma casa onde vivem três poodles e um rottweiler era usada como abatedouro de cães e gatos na periferia de Suzano, na Grande SP. Após um mês de investigação, o policial prendeu ontem uma casal suspeito de matar e vender os animais para restaurantes coreanos.

Pela legislação brasileira, a venda desse produto é ilegal. Segundo o Ministério da Agricultura, só podem ser comercializados produtos descritos no decreto 30.691/ 1952. Lá constam carnes de bois, cavalos, suínos, aves e outros, mas não há nenhuma referência a

to Mornis, 41, e Roselli Nascimento, 39, foram encontrados 60 kg de carne canina refriada, dois gatos mortos e equipamentos usados nos abates, como machado, ganchos e um

Segundo a polícia, os animais abatidos viviam nas ruas e eram atraídos com ossos e comida até a casa onde o casal vivia com três filhos.

A carne, conforme a Polícia Civil, era vendida para restaurantes localizados no Bom Retiro (região central de SP) e custavam entre R\$ 180 e R\$ 220 por bicho.

Encenamento

O esquema funcionava havia três anos. O casal recebia cerca de dez encomendas por semana. Quatro pessoas, proprietárias de dois restaurantes no Bom Retiro, também foram presas. Procurados pela Folha, seus advogados não quiseram comentar o assunto.

Na casa do casal, os animais eram engordados e mortos a machadadas. A carne era queimada com um maçarico. Quando eram vendidas, as cabeças e patas acabavam incineradas.

Os policias chegaram até o abatedouro depois de uma denúncia sobre a venda de carne de cachorros em restaurantes coreanos. Na noite de quarta-feira, ligaram para o casal encenando a carne dos animais. A entrega foi marcada para ontem, antes das 7h, quando o casal foi preso. Conforme a polícia, eles serão indicados por crueldade contra animais, formação de quadrilha e crime contra o meio ambiente. "É um grave crime contra a saúde pública", disse o delegado.

Adriano Vaccari / Futura Press

Fonte: Jornal Folha de São Paulo, Caderno Cotidiano, p. C1 ,13 de novembro 2009.

FOLHA DE S.PAULO
SEXTA-FEIRA, 13 DE NOVEMBRO DE 2009 cotidiano C3

Cardápio mostra prato com carne de cachorro a R\$ 30

Menu de restaurante coreano no Bom Retiro tinha também uma imagem de cão

Consumo é comum na Coreia do Sul e em parte da China; no Brasil, lei impede comércio por questão cultural, diz ministro

COLABORAÇÃO LOCAL: COLABORADOR DA FOLHA

A imagem de um cachorro acompanhada da frase "Quem sabe o prato entende o que está mexendo". É assim que o cardápio de um dos restaurantes coreanos do Bom Retiro investigado pela Folha se refere à iguaria, que custa R\$ 30.

De acordo com a polícia, os donos do restaurante disseram que a foto foi colocado no cardápio por engano no lugar da imagem de um cão.

Quatro coreanos donos de dois restaurantes fizeram pressão sobre a autarquia de inquérito a afirmar que o consumo de carne de cão é crime contra o consumidor. Um delas, Tae Sun Choi, estava num o vício de permanência viciado.

Além o ódio de morte de ontem, Choi e os empresários Moi Noachul, Ho Noi Park e Ram Oh Park Chung continuaram diafônias no Departamento de Relações Públicas da Folha.

Os advogados das quatro coreanas estavam no final de instante na delegacia, mas não falam com a Folha até a conclusão desta edição.

Costume

O consumo de carne de cachorro é comum na Coreia do Sul e em algumas regiões da China. No Brasil, a legislação proíbe o comércio por uma questão cultural, segundo

informou o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Vetos como animais de comércio não há proteção legal para cães, gatos, morcegos, ratazanas e abelhas. Nem mesmo a Importação do produto é permitida.

Desde julho do ano passado, o ministério analisa a revisão do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Essas

regras tratam, dentre outros assuntos, do abate, do consumo e da comercialização de animais no Brasil.

No entanto, pura conta de ameaça cultural, considerando o ministro, não há previsão para que seja autorizado o consumo de carne de cães e gatos.

Das 300 Fazendas, a lei estabeleceu 11.937 pratos que animais domésticos não podem ser criados para o consumo.

Adriano Vaccari / Futura Press

단체 손님 예약 바랍니다.
(20명 이상)

1인당 30.00
양념 카 토랑 40.00

Cardápio com imagem de cão em restaurante coreano em SP

Fonte: Jornal Folha de São Paulo, Caderno Cotidiano, p. C3 ,13 de novembro 2009.

Restaurante coreano burla vigilância e reabre

Donos do estabelecimento no Bom Retiro estão presos sob a suspeita de vender pratos feitos com carne de cachorro

Reportagem flagrou consumidores no local por volta do meio-dia de ontem; acionada, fiscalização chegou depois e nada encontrou

AFONSO BENITES
DA REPORTAGEM LOCAL

Um dia após ter sua cozinha interditada pela Vigilância Sanitária, o restaurante coreano Por Que Chama, localizado na rua Guarani, no Bom Retiro, funcionou ontem e uma de suas quatro mesas estava ocupada por clientes. Os donos do estabelecimento estão presos desde anteontem sob a suspeita de comercializar pratos feitos com carne de cachorro.

Após a Folha constatar a reabertura do local, por volta das 12h de ontem, e entrar em contato com a Secretaria Municipal de Saúde, fiscais da vigilância foram até o restaurante, mas não encontraram nenhum alimento sendo consumido, conforme a secretaria.

O estabelecimento estava proibido de vender alimentos porque sua cozinha estava em condições precárias de uso e não respeitava uma série de normas, segundo a vigilância.

No documento que oficializou a interdição, o órgão informou que medidas de higienização precisariam ser tomadas antes da reabertura e, conforme os fiscais, era isso que esta-

ção de quadrilha, crimes contra o consumidor e maus tratos contra animais, não foram encontrados. A reportagem conversou com uma funcionária do local, pediu para que um responsável entrasse em contato, mas não teve resposta até a conclusão desta edição.

O outro restaurante coreano investigado pela polícia por também vender comida de cachorro estava funcionando ontem. Porém apenas clientes selecionados tinham acesso a ele.

O estabelecimento não chegou a ser interditado. Ele foi autuado anteontem por irregularidades na cozinha.

Sem nenhuma identificação em sua entrada, o restaurante Ho Nan Park, mesmo nome de seu proprietário, só aceita clientes previamente identificados. Brasileiros não entram, segundo comerciantes coreanos da redondeza. Os advogados desse estabelecimento não foram encontrados ontem. Park e o outro proprietário, Kun Ok Park Chung, continuavam presos, segundo a polícia.

Anteontem, a polícia achou em Suzano (Grande SP), um abatedouro de cães e gatos na casa de Roberto Moraes, 41, e Roseli Nascimento, 39. No local, foram apreendidos 60 quilos de carne canina e dois gatos mortos. O casal, segundo a polícia, tinha como clientes restaurantes do Bom Retiro. Os dois foram presos. O consumo



Leonardo Wen - 12.nov.2009/Folha Imagem

ANÁLISE

Comer cachorro é um fato antropológico

HÉLIO SCHWARTSMAN
DA EQUIPE DE ARTICULISTAS

Que coreanos comam cachorros é um fato antropológico que não deveria causar maior surpresa nem revolta.

Franceses deliciam-se com cavalos e rãs, chineses devoram tudo o que se mexe —af incluídos escorpiões e gafanhotos— e boa parte das coisas que não se mexem também. Os papuás da Nova Guiné, até algumas décadas atrás, faturavam-se no consumo ritual dos miolos de familiares mortos. Só pararam porque o hábito estava lhes passando o kuru, uma doença neurológica grave.

Nosso consolidadíssimo costume de comer vacas configura, aos olhos dos hinduístas, nada menos do que deídio.

A não ser que estejamos prontos a definir e impor um universal alimentar, é preciso tolerar as práticas culinárias alheias, por mais exóticas ou repugnantes que nos pareçam.

Nada disso justifica o abate, por meios crueis, de cães num matadouro clandestino em Su-

A cidade de São Paulo conta hoje com mais de 1,6 milhão de cachorros. Por mais que simpatizemos com os cães, eles chegam a uma situação de descontrole populacional, que precisa ser remediada.

É claro que não o faremos devorando os animais excedentes. Mas a solução tampouco virá de medidas populistas como a lei paulista nº 12.916/08, que, exceto em casos muito especiais, proibiu os órgãos de controle de zoonoses de proceder à eutanásia de cães e gatos.

O resultado foi que esses serviços praticamente pararam de recolher animais. Como a natureza segue seu curso, em vez de ser sacrificados sem dor, eles acabam morrendo vítimas de atropelamentos e doenças.

Pesquisas de veterinários de USP, Unip, Unicurul e Metodista mostrou que, mesmo antes da introdução da lei, os cães da região metropolitana de SP viviam só três anos, contra 9,9 nos EUA e 11 na Inglaterra.

O melhor caminho para resolver o problema é por meio da castração, que precisa che-

Fonte: Jornal Folha de São Paulo, Caderno Cotidiano, p. C4 ,14 de novembro 2009.

Marina Terni Lamas

Métodos analíticos para a identificação de espécies animais

Botucatu, 2011

Marina Terni Lamas

Métodos analíticos para a identificação de espécies animais

Trabalho de conclusão de curso apresentado à graduação visando à obtenção do grau de médico veterinário.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Botucatu, SP.

Área de concentração: Inspeção de Alimentos de Origem Animal e Saúde Pública

Preceptor: Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Coordenador de estágios: Profa Dra. Titular Jane Megid

Universidade Julio de Mesquita Filho (UNESP)

Botucatu, 2011

RESUMO

A indústria alimentícia tem se modernizado rapidamente, e com isso a disponibilização e o consumo de alimentos industrializados vem crescendo continuamente. Esses produtos perdem suas características morfológicas originais, necessitando portanto de testes rápidos e confiáveis que permitam a identificação das espécies animais, visto que a maioria das fraudes tanto em leite e derivados, quanto em carnes e pescados, se dá pela troca parcial ou total da matéria prima original por outra de menor valor no mercado.

Atualmente existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para a identificação de espécies animais, baseando-se em análises de proteínas musculares ou DNA. No caso das técnicas baseadas em análises de proteínas, pode-se citar diversos tipos de eletroforese, e métodos imunológicos como o ELISA. No caso nas técnicas baseadas em DNA existem diversos ensaios, que utilizam como base a amplificação de fragmentos de DNA, conhecida como PCR. Todas essas técnicas apresentam vantagens e desvantagens que variam de acordo com fatores como o estado de conservação da amostra, e o grau de proximidade entre as espécies analisadas. Por esse motivo faz-se necessário um estudo em busca do aperfeiçoamento das técnicas atualmente disponíveis, visto que a confirmação da autenticidade de um alimento é necessária para assegurar o valor do produto, o cumprimento dos regulamentos de rotulação, e proteger o consumidor de fraudes.

Palavras chave: Identificação; Espécies; Eletroforese; ELISA; PCR.

ABSTRACT

The food industry has been rapidly modernized, and with this the disposal and the consumption of industrialized food has been increasing continually. These products lose their original morphological characteristics, requiring fast and reliable tests that could help to identify the species in question, as most fraudulent behavior in the milk and dairy industry (meat and fish) is carried out where there is partial or total exchange of the original material for other with less value at market. Nowadays there is a lot of techniques that can be used for the identification of animal species, based on muscle protein, or DNA analysis. In the case of protein based analysis, we can mention several types of electrophoresis and immunologic methods, as ELISA. In the case of DNA based methods, we have several assays that use the amplification of DNA fragments, known as PCR, as proof. All these techniques have advantages and disadvantages that can be affected by factors- the sample condition, or the degree of relation between the species in question. Because of this, it's necessary that a continuous study looking for the improvement of the available techniques, making sure that the confirmation of food authenticity is in place. This is to ensure the true product value, to comply with labeling regulationand and protect the consumer of frauds.

Key words: Identification; Species; Electrophoresis; ELISA; PCR.

Sumário

Resumo	3
Abstract	4
Introdução	6
Técnicas baseadas na análise de proteínas.....	7
Técnicas cromatográficas	11
Técnicas imunoenzimáticas	12
Técnicas baseadas na análise de DNA	14
Conclusão	18
Referencias bibliográficas	18

1. Introdução.

Garantir a autenticidade dos alimentos de origem animal é tarefa nem sempre fácil. A maioria das fraudes tanto em leite e derivados, quanto em carnes e pescados, se dá pela troca parcial ou total da matéria prima original por outra de menor valor no mercado, permitindo assim aumento do lucro do produtor. Com o aumento do consumo de alimentos industrializados a identificação de espécies tem se tornado cada vez mais importante, visto que produtos industrializados perdem suas características morfológicas originais, exigindo testes de identificação cada vez mais rápidos, confiáveis, e reproduzíveis. A confirmação da autenticidade de um alimento é necessária para assegurar o valor do produto, o cumprimento dos regulamentos de rotulação, e proteger o consumidor de fraudes, que criam competições desleais e distorções de mercado, podendo ter impacto na economia local ou global. Além disso as fraudes são prejudiciais aos consumidores por razões relacionadas a intolerância ou alergia, religião, objeções étnicas ou culturais e requerimentos legais.

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a identificação de espécies animais, sejam elas genéticas ou imunológicas. Entretanto os métodos atuais para reconhecimentos de espécies são baseados no descobrimento do polimorfismo protéico ou características do ácido desoxirribonucléico (DNA) que são únicas para cada espécie, ou na análise de proteínas musculares por métodos de eletroforeses ou técnicas imunológicas.

Quando se fala de técnicas baseadas em DNA, deve-se levar em consideração que é necessário primeiramente o estabelecimento de uma impressão digital otimizada para a espécie do produto sob investigação, que seja capaz de produzir resultados reproduzíveis e inconfundíveis, e que provem a identificação da espécie. (Woolfe and Primrose 2004). Complicações podem surgir quando certo número de espécies tem impressões digitais similares, ou quando indivíduos da mesma espécie mostram impressões digitais diferentes, devido a variações intra-espécies. Além disso, sabe-se que algumas etapas de

processamento desnaturam proteínas e degradam parcialmente o DNA, fazendo com que a análise de alimentos processados seja especialmente exigente. (Mackie and others 1999; Chapela and others 2002). Alguns componentes adicionados aos alimentos processados também podem servir como inibidores da amplificação do DNA durante a reação de cadeia polimerase (PCR) (Teletchea and others 2005).

O diagnóstico analítico de peixes e frutos do mar tem sido tradicionalmente baseado em eletroforese espécie - específica, cromatografia ou características imunológicas de proteínas. (Civera 2003; Moretti and others 2003). Alguns métodos comuns incluem foco isoelettrico (IEF), eletroforese capilar (CE), cromatografia líquida de alta performance (HPLC), e sistemas de imunoensaios. Enquanto esses métodos são em geral confiáveis para o uso em tecido fresco ou congelado, tratamentos com calor intenso ou secagem podem destruir propriedades bioquímicas e a integridade de proteínas, tornando impraticável a análise com alguns dos métodos acima citados. (Mackie and others 1999; Akasaki and others 2006).

Um método baseado em proteína que pode revelar-se útil, até mesmo em produtos esterilizados por calor, é o Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), que foi usado para a identificação de várias espécies de peixes e produtos lácteos e cárneos (Carrera and others 1997; Asensio and others, 2008). Entretanto, imunoensaios podem ser inefetivos em diferenciar espécies intimamente relacionadas, e requerem o desenvolvimento de um anticorpo contra a proteína específica de interesse (Sotelo and others 1993; Woolfe and Primrose 2004), método que pode ser muito trabalhoso.

Quando comparamos o uso de métodos baseados em DNA com os métodos baseados em proteínas, o uso de DNA apresenta como vantagens maior especificidade, sensibilidade, e performance confiável com amostras altamente processadas. (Lenstra 2003). Entretanto, nas técnicas baseadas em análises de proteínas, as amostras podem ser analisadas rapidamente, o custo dos reagentes é relativamente baixo, e as técnicas são fáceis de aprender.

2. Métodos baseados na análise de proteínas

2.1 Técnicas eletroforéticas

A eletroforese é um procedimento analítico baseado na separação de moléculas carregadas em meio aquoso, sob a influência de campo elétrico aplicado entre dois eletrodos, um positivo e outro negativo. O movimento das moléculas, neste caso proteínas, dependerá de seu tamanho e da carga que apresentem no Ph do tampão selecionado para a analise. Aquelas moléculas que tenham uma carga maior, tenderão a mover-se mais rapidamente que aquelas com menor carga. No caso de que estas sejam iguais, as moléculas menores de moverão com maior rapidez.

A identificação de espécies se realiza comparando o perfil eletroforético obtido a partir das proteínas musculares das amostras problemas, com os padrões de bandas de amostras de referencia. A comparação pode ser visual, ou utilizando densitômetro ou analisador de imagens. Habitualmente, porém com algumas exceções, para comparar os padrões de bandas é necessário analisar as amostras de referencia no mesmo gel que as desconhecidas, já que pequenas mudanças nas condições experimentais podem alterar os perfis protéicos obtidos(AOAC,1990).

As técnicas eletroforéticas incluem vários sistemas de separação. A seleção de um ou outro vai depender do grau de resolução que se deseje obter, assim como o tipo de amostra que se quer analisar: fresca ou congelada, submetida a tratamento térmico leve ou a processo de esterilização.

Em geral, as técnicas eletroforéticas em gel tem sido pouco utilizadas devido a seu baixo poder de resolução. Sem duvida, o isoeletroenfoque (IEF), a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) e a eletroforese capilar (EC) são os sistemas eletroforéticos mais utilizados na identificação de espécies animais.

2.1.1. Isoeletroenfoque (IEF)

É uma técnica que permite separar componentes que se diferem em até 0,001 unidades de Ph. Quando se aplica campo elétrico, as proteínas migram em direção aos diferentes eletrodos segundo sua carga elétrica. A proteína entra em zonas de ph mais baixas e mais altas de acordo com a relação carga neta/curva de ph, motivo pelo qual vai perdendo sua carga neta. Quando a proteína alcança seu ponto de isoeletroenfoque a separação depende do ponto isoelétrico da proteína e não de sua carga ou tamanho.

A técnica de isoeletroenfoque pode ser realizada tanto em géis de poliacrilamida, como em géis de agarosa tratada quimicamente (agarosa IEF). A agarosa não apresenta os inconvenientes de neurotoxidade, e dificuldades na polimerização que tem a acrilamida. Sem dúvida, a resolução que se obtém com os géis de agarosa é menor, ainda que em ocasiões suficiente para identificar inclusive espécies filogeneticamente próximas (Santín y Centrich, 1997). Por outro lado, os inconvenientes de polimerização da policrilamida se podem resolver mediante o emprego de géis comerciais.

Esta técnica tem sido utilizada na identificação de numerosas espécies de animais de abate, e seu grande poder de resolução tornou possível sua aplicação tanto em produtos frescos como naqueles submetidos a tratamentos térmicos.

Slattery y Sinclair (1983) empregaram com êxito esta técnica para diferenciar carnes frescas procedentes de distintas espécies animais como bovina, bubalina e canguru. Entretanto, não puderam diferenciar carnes procedentes de espécies estreitamente relacionadas como a ovelha e a cabra, ou o cavalo e o burro.

Bauer y Hofmann (1989) identificaram mediante isoeletroenfoque em gel de poliacrilamida a presença de carne de vaca, porco, frango, peru, cavalo e ovelha em uma grande variedade de preparados e produtos cárneos (carnes picadas, hambúrgueres, embutidos crus e curados, salsichas, etc).

Em comparação com outras técnicas eletroforéticas, o IEF apresenta numerosas vantagens: melhor resolução e sensibilidade; a possibilidade de modificação da técnica em muitos aspectos ajustando-se as necessidades analíticas , as variações nos parâmetros experimentais influenciarem pouco no padrão protéico obtido, o que permite utilizar fotografias de amostras de referencia obtidas anteriormente na comparação com as amostras de interesse, além da utilização de géis preparados comercialmente e aparelhos semi automatizados, que permitem maior reproduzibilidade dos resultados assim como uma diminuição no tempo requerido para cada análise.

A técnica de IEF, sem dúvida, apresenta também inconvenientes importantes: os perfis protéicos obtidos tem grande numero de bandas e sua interpretação pode ser complicada em alguns casos; se trata de técnica laboriosa que requer operários especializados e

instrumental adequado, e é cara, o que dificulta sua implantação em laboratórios de análises de alimentos.

2.1.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Esta técnica consiste em dissolver as proteínas da amostra em soluções de detergente aniônico dodecil sulfato sódico (SDS). Deste modo, as proteínas perdem suas cargas individuais adquirindo uma carga neta negativa como resultado do complexo proteína-anion SDS formado (Weber y Osborn, 1969). A quantidade de detergente que se incorpora por unidade de massa é a mesma para todas as proteínas, e em consequência, a mobilidade na eletroforese vai depender exclusivamente da massa. A separação das proteínas, uma vez dissolvidas, se realiza em géis de poliacrilamida adicionados de SDS. A eletroforese em géis de poliacrilamida com SDS tem sido utilizado amplamente para a identificação de espécies em amostras submetidas a tratamento térmico, já que o detergente SDS permite a extração das proteínas desnaturadas que se encontram neste tipo de amostras. Por meio desta técnica já foi possível detectar fraudes em mesclas de carne de cavalo, vaca e porco e foie grãs de pato, em níveis a partir de 10% de incorporação de outra espécie. Também já foi possível, ainda que com algumas modificações na técnica, a identificação de espécies em amostras submetidas a esterilização ou fortes tratamentos térmicos (Carrión y col, 1981).

Quanto aos inconvenientes para a técnica de SDS-PAGE, se pode dizer que são os mesmo que foram mencionados para a IEF. Ou seja, a complexidade nos perfis protéicos obtidos e a necessidade de operários e instrumental especializado.

2.1.3. Eletroforese Capilar (EC)

A eletroforese capilar é uma técnica eletroforética que também tem sido aplicada na diferenciação de espécies. Esta técnica se baseia na utilização de capilares como câmeras de separação, onde um capilar de sílica é preenchido com um tampão e submetido a um campo elétrico. Sob estas condições, os cátions presentes na amostra migram até o cátodo em função de sua relação carga/massa. A vantagem que este método apresenta com respeito as outras técnicas de análise, é que permite detectar e quantificar simultaneamente diferentes

moléculas, já que o equipamento esta dotado de sistema que elimina o tampão de preenchimento da coluna e o substitui por outro de forma automática, permitindo analisar os diferentes componentes da amostra sem necessidade de intervir. Outras vantagens deste método são a rapidez da analise, que pode ser feita em menos de 10 minutos ainda que tenha estabelecido tempo médio de 20 minutos, e o pequeno volume necessário. Apesar de inicialmente ter se atribuído a técnica falta de sensibilidade, este problema esta sendo sanado na atualidade mediante a introdução de melhorias nos sistemas de detecção. Sua principal limitação reside, sem duvida, no ajuste de sistemas de detecção adequados para cada composta que, além disso, tem que ser muito sensíveis devido aos pequenos volumes que são utilizados. No caso das proteínas, normalmente são utilizados sistemas de detecção ultravioleta (UV) (Cancalon,1995).

Existem distintos tipos de EC, porém a mais comum é a eletroforese capilar de zona (ECZ), que utiliza reativos de amplo intervalo de pH para separar os distintos componentes em uma amostra . A analise mediante ECZ da fração sarcoplasmática das proteínas do músculo, permitiram a identificação de distintas espécies de animais de abate, tanto frescas quanto congeladas.

Cota Rivas e Vallejo-Córdoba (1997,1998) diferenciaram espécies como bovina, suina e peru utilizando esta técnica. Os perfis de proteínas sacoplasmáticas obtidos para cada uma das espécies estudadas, resultaram ser espécie-específicos.

A eletroforese capilar permite analise completamente automatizada de proteínas. Isto supõe importante vantagem frente aos atuais métodos eletroforéticos, que são laboriosos e querem operários especializados.

2.2. Técnicas cromatográficas

2.2.1. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) é um procedimento analítico baseado na separação de moléculas em função de sua diferente polaridade. A técnica de HPLC em fase reversa (RP-HPLC), é a que mais se tem utilizado na identificação de espécies animais, e permite separar as proteínas distribuindo-as entre uma fase móvel polar e uma fase orgânica que está fixa em

uma matriz. Deste modo obtém-se perfis cromatográficos de proteínas característicos de cada espécie, que permitem sua identificação mediante comparação com cromatogramas de referência.

Os cromatogramas das proteínas sarcoplasmáticas obtidos mediante RP-HPLC tem permitido a identificação de bom numero de espécies animais, tanto frescas como congeladas. Entre elas suíños, aves (peru, pato, frango) bovina e ovina.

Espinoza y col (1996) identificaram e quantificaram ao redor de 50 espécies animais diferentes, analisando mediante RP-HPLC a hemoglobina sanguínea.

Toorop y col (1997) identificaram amostras frescas de bovinos, ovinos, suíños e aves mediante HPLC empregando proteínas miofibrilares. Em outro trabalho, Toorop y col (1997b) aplicaram a técnica de HPLC para detectar a porcentagem de incorporação de carne suína em amostras frescas, congeladas e cozidas de carne bovina.

O RP_HPLC apresenta vantagens importantes frente as técnicas eletroforéticas: é rápido, simples, tem grande poder de resolução, não se utilizam reativos tóxicos e uma vez obtidos os cromatogramas, não é necessária a análise conjunta de amostras de referência graças a grande reproducibilidade dos resultados. Além disso, o uso desta técnica é especialmente interessante desde o ponto de vista da quantificação, já que os sistemas de detecção poderiam ser empregados para estimar a quantidade de proteínas pertencente a uma espécie presente em uma mescla. (Toorop y col, 1997).

2.3. Técnicas Imunoenzimáticas (ELISA)

As técnicas imunológicas são procedimentos analíticos baseados na reação específica entre um antígeno e seu anticorpo correspondente. A aplicação dessas técnicas para a identificação de espécies apresenta importantes vantagens frente ao emprego de técnicas eletroforéticas e de HPLC, como a diminuição da quantidade de amostra necessária, redução do tempo e do custo da análise, utilização de instrumental pouco complexo, possibilidade de automatização e de aplicação em provas de campo e kits miniaturizados.

As técnicas de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), que são amplamente utilizadas na atualidade, se caracterizam pelo emprego de marcadores enzimáticos para a detecção e amplificação das reações antígeno anticorpo. Nessas técnicas um dos elementos da reação imunológica (antígeno ou anticorpo) se fixa à fase sólida, normalmente uma

placa de poliestireno. A interação antígeno-anticorpo se detecta mediante a reação colorimétrica produzida pela enzima ao degradar o substrato correspondente. A medida da absorbância nos poços da placa permite quantificar a reação imunológica.

Para a realização deste tipo de ensaio, podemos utilizar 2 tipos de anticorpos: os monoclonais, e os policlonais. Os monoclonais, são células homogêneas derivadas de uma célula produtora de anticorpos, e possuem a mesma especificidade necessária para um antígeno. Os policlonais são clones de células únicas propagadas em meio de cultura com uma única especificidade. Geralmente, os anticorpos são altamente específicos, e ao reagirem com o antígeno, formam um complexo precipitado. Segundo Hurley(2004) o tipo de anticorpo utilizado pode alterar a eficiência do ELISA, pois os anticorpos policlonais podem ser menos específicos que os anticorpos monoclonais. Segundo Benjamini(2002), esse fato se dá devido à reação cruzada de anticorpos policlonais, onde essas células, por terem especificidade um pouco menor, reagem com duas moléculas que apresentam o mesmo antígeno, mas que são diferentes em outros aspectos.

As técnicas imunoenzimáticas tem se desenvolvido em diversos formatos atendendo ao componente da reação que se fixa em primeiro lugar, a fase solida utilizada e se usam ou não concentrações limitantes de antígeno e anticorpo. Há inúmeras aplicações dessas técnicas na diferenciação de espécies em carnes e produtos cárneos bem como em produtos lácteos. De fato, atualmente existem a disposição no mercado kits comerciais rápidos, para a identificação de espécies em mesclas cárneas ou lácteas, e também para a detecção dessas proteínas em outros produtos alimentícios.

2.3.1. Immunodotting

A técnica de immunodotting é uma modificação do ELISA indireto, em que o ensaio é feito em matriz de celulose, ao invés de placa de poliestireno, e os substratos utilizados são outros. Neste caso, o produto da reação enzimática é insolúvel e precipita no local de formação, permitindo a visualização de bandas manchadas. A técnica de immunodotting apresenta como vantagens sobre o ELISA, a possibilidade de unir e imobilizar número maior de moléculas que as placas de poliestireno, alem da utilização de menor quantidade

de amostra, e da maior rapidez e facilidade na realização do ensaio. Seu principal inconveniente no entanto, é se tratar de uma técnica qualitativa.

2.3.2. ELISA Direto ou sanduíche

O método de sanduíche, ou captura, é indicado para identificação de抗ígenos, e este抗ígeno fica entre dois anticorpos. Assim, um anticorpo primário específico ao抗ígeno é adsorvido no poço da microplaca. Em seguida o抗ígeno na solução problema é adicionado. Depois o segundo anticorpo específico ao抗ígeno e marcado com uma enzima é adicionado. Esta enzima degrada o substrato fazendo com que ele mude de cor. A presença de cor nos poços indica a presença do抗ígeno, e os poços que não mudarem de cor indicam a ausência do抗ígeno em questão. Nesse caso, a intensidade da reação é proporcional à quantidade de抗ígeno presente.

2.3.3. ELISA Competitivo

O método competitivo é mais usado para identificação de抗ígenos, mas pode também ser empregado para a detecção de anticorpos. Neste método primeiro se adsorve o anticorpo no poço da micro placa. Após a adsorção do anticorpo, uma solução que possivelmente contém o抗ígeno é adicionada sobre os anticorpos adsorvidos. O próximo passo é adicionar o抗ígeno marcado enzimaticamente. Os poços que não possuem o抗ígeno primário (da solução problema) aderido ao anticorpo ficam coloridos, enquanto que os poços que possuem抗ígenos aderidos aos anticorpos não mudam de cor.

2.3.4. ELISA indireto

Nesta técnica, o抗ígeno se adsorve em primeiro lugar a uma fase sólida. Em seguida se adiciona o anticorpo, que se une ao抗ígeno imobilizado. Este anticorpo pode estar diretamente conjugado à enzima, ou pode-se adicionar um segundo anticorpo marcado enzimaticamente que reconheça como抗ígeno o anterior. Finalmente, se adiciona o substrato específico da enzima. A degradação do substrato pela enzima produz reação colorimétrica, quantificável por espectofotometria.

2.4 Técnicas Baseadas na análise de DNA

Técnicas baseadas na análise de ácidos nucléicos, como o DNA mitocondrial ou genômico, apresentam diversas vantagens sobre técnicas baseadas em proteínas. Primeiramente, o fato de todas as células de um indivíduo apresentarem informação genética idêntica, é possível realizar análises independentemente da origem do material. Além disso, a molécula de DNA contém mais informação e é mais estável do que as proteínas, mas permitindo sua extração de diferentes tipos de amostras e até mesmo de amostras danificadas. Outro ponto importante é o uso do DNA mitocondrial, que evolui muito mais rapidamente, e contém maior diversidade seqüencial que o DNA nuclear, facilitando portanto a identificação de espécies intimamente relacionadas. (PCR-RFLP).

2.4.1. FINS

Forensically informative nucleotide sequencing (FINS). FINS é um procedimento DNA-baseado. Para identificar uma espécie usando FINS, um fragmento de DNA específico é amplificado por PCR, sua seqüência de nucleotídeos é determinada, e a seqüência é então comparada com seqüências relacionadas em banco de dados usando análise filogenética. A sequência com menor distância genética, ou número de substituições de nucleotídeos do fragmento alvo, representa o grupo de espécies do qual a amostra original pertence. (Barlett and Davidson 1992). Como FINS é baseado em seqüência de substituição de nucleotídeos, é importante selecionar um fragmento que exiba alta variabilidade interespécies e baixa variabilidade intraespécie, para evitar ambigüidades na determinação das espécies (Bossier 1999), por ter essa característica, uma escolha comum é o uso do citocromo B ribossomal.

Apesar do seqüenciamento ter sido provado como o mais direto e confiável método de obtenção de informação dos fragmentos de PCR, é também caro e demorado, tornando impraticável seu uso na rotina de muitos laboratórios. Além disso o seqüenciamento não é apropriado para a análise de amostras contendo mais de uma espécie. (Lenstra 2003).

2.4.2. RFLP

Uma alternativa popular ao FINS é o PCR-RFLP, o qual é baseado no polimorfismo do comprimento de fragmentos particularmente restringidos do código genético. Em alguns

casos, as variações espécie-específicas de comprimento dos fragmentos selecionados podem ser analisada pela amplificação por PCR e visualização em gel de agarose. Entretanto, quando a variação é muito pequena (menor que 100bp), as amplificações podem ser digeridas com enzimas de restrição (endonucleases), que são analisadas usando gel de eletroforese.

Para estabelecer um protocolo de identificação de espécies por PCR-RFLP, o fragmento alvo de DNA precisa inicialmente ser amplificado por PCR e então seqüenciado para identificar polimorfismos na espécie de interesse. Em seguida, são escolhidas enzimas de restrição apropriadas para reconhecer e cortar sequências específicas de DNA, resultando num padrão de fragmentos específicos que variam com as espécies (Liu e Cordes 2004).

Uma vez que a sequência do fragmento tenha sido estabelecida, os passos iniciais não são mais necessários, pois o fragmento de interesse é facilmente replicado com as enzimas de restrição pré-selecionadas, e então comparado com as amostras de referencia, para a identificação da espécie. Assim como no FINS, o fragmento de DNA mais comumente utilizado é o citocromo B mitocrondrial., que já foi utilizado na identificação de diversas espécies de pescado, entre elas os atuns, e na detecção de carne de porco em misturas de carne bovina cozida, em níveis menores que 1% (Meyer R., 1995)

Os resultados desses estudos mostraram que o PCR-RFLP é adequado para a analise de espécies intimamente relacionadas, amostras contendo mais de uma espécie misturadas, e amostras que foram submetidas a diversos leveis de processamentos, incluindo esterilização por calor.

Apesar do PCR-RFLP ter se tornado um método proeminente no campo da identificação de espécies, ele também apresenta algumas desvantagens. A maior delas é a possibilidade de variações intra espécies, onde indivíduos da mesma espécie exibem padrões de restrição diferentes, devido a degeneração do DNA do fragmento analisado. (Mackie and others 1999; Lockley and Bardsley 2000; Akasaki and others 2006). Então, para evitar falsos negativos, é necessário analisar grandes números de indivíduos de uma mesma espécie, para encontrar um padrão de restrição. Devido a essas limitações, é recomendado que a identificação de espécies por este método seja feita com cautela quando não houver informações suficientes sobre o polimorfismo das espécies analisadas.

O uso de polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) também tem sido usado para autenticar pescados enlatados (Ram et al., 1996; Quinteiro ET AL., 1998) Os resultados indicaram que esse método proporciona uma alternativa simples e de bom custo-benefício para o seqüenciamento na identificação de espécies.

2.3.3. Single-Stranded Conformational Polymorphism (SSCP)

É alternativa para métodos como FINS ou RFLP, especialmente quando estão sendo analisadas espécies intimamente relacionadas, pois é uma técnica altamente sensível. Em geral, a análise por SSCP tem sido baseada em variações na sequência do citocromo b mitocondrial. Apesar de não ter sido utilizado tão amplamente quanto PCR-RFLP ou métodos de seqüenciamento, o SSCP já foi capaz de identificar certa variedade de peixes, como salmonídeos, atuns, e sardinhas. (Rehbein and others 1997). Apesar de seu sucesso, a técnica ainda é mais exigente que o RFLP e continua tendo certas desvantagens como a alta reprodutibilidade sem diferenças nas condições de uma análise para outra, e a necessidade de realizar os ensaios das amostras de referência e das amostras desconhecidas no mesmo gel.

2.3.4. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Diferente dos métodos citados acima, o RAPD não tem como alvo fragmentos pré-determinados de DNA. Um primer arbitrário é designado sem prévio conhecimento da sequência alvo de DNA,, e durante o PCR esse primer amplifica segmentos de DNA aleatoriamente. Devido às variações no código genético, as análises em diferentes espécies resultam padrões únicos de fragmentos de DNA. RAPD tem potencial para ser usado como uma ferramenta precisa, rápida e relativamente barata para detectar fraudes comerciais. Comparado com outros métodos disponíveis o RAPD tem sido sugerido como o mais barato e mais confiável método para identificação inter e intra espécies quando não há conhecimento prévio da sequência genômica (Ramella and others 2005, Liu and others 2004). Como desvantagens deste método podemos considerar a necessidade de manter as condições de reação rigorosamente constantes, para assegurar que as marcas do DNA produzidas refletem precisamente as espécies correspondentes, e a possibilidade de falsos

positivos, que ocorreriam quando diferentes regiões do DNA, de 2 espécies diferentes produzem fragmentos de PCR de tamanho similar.

3. Conclusão

Atualmente existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para de identificar e consequentemente combater fraudes na indústria alimentícia, cada qual com sua particularidade de aplicação, vantagens e desvantagens. Não é possível definir uma só técnica que possa ser utilizada em todas as ocasiões, em todos os laboratórios ou com todas as espécies animais, pois ainda não existe técnica perfeita. Por esse motivo é necessário continuar investigando e aperfeiçoando as técnicas atuais, em busca de um método cada vez mais eficaz, confiável, acessível e reproduzível em larga escala. Pode-se assim, atender a demanda cada vez maior do consumidor por produtos de qualidade e origem confiáveis.

Bibliografia

- Akasaki, T.; et al. Species identification and PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene in cod fish products. *Journal of Food Science*, n.71, p.190-195, 2006.
- Asensio. L.; González. I.; García. T.; e Martín. R. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, n.19, p.1-8, 2008.
- Barlett, S.E.; Davidson, W.S. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *Bio Tech*, n.12. cap.3, p.408-411.
- Barnes, K.W. An introduction to food analysis techniques. *Food Technology*, n.49, p.47-50.
- Bossier, P. Authentication of seafood products by DNA patterns. *Jounal of food science*, v.64, n.2, 1999.
- Cancelon, P.F. Capillary electrophoresis: a useful technique for food analysis. *Food Technology*, n.49, p.52-58.
- Carrera. E. et al. Inmunostick colorimetric ELISA assay for the identification of smoked salmon (*Samo* *salar*), trout (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama rau*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, n.74, p.547-550, 1997.
- Carrera. E.;Martín. R.; García. T.; González. I.; Sanz. B. e Hernández. P. E.: Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of smoked salmon (*Samo* *salar*), trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) and bream (*Brama rau*). *Journal of the Science of Food Protection*, n.59, p.521-524, 1996.
- Chapela, M. J. et al. Identification of cephalopod species in seafood products by forensically informative nucleotide sequencing (FINS). *Journal of Food Science*, n. 67, cap.5, p.1672-1676, 2002.
- Civera, T. Species identification and safety of fish products. *Veterinary Research Communications*, n.27, p.481-491, 2003.
- Cota-Rivas, M., Vallejo-Cordoba, B.V. Capillary electrophoresis for meat species differentiation. *Journal of Capillary Electrophoresis* n.4, p.195-199, 1997.
- DIAS, Sabrina da Silva; LOBATO, Verônica; VERRUMA-BERNARDI, Marta Regina. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, São Paulo, v. 68, n. 3, 2009.
- Espinoza, E.O., Kirms, M.A.; Filipek, M.S. Identification and quantification of source from hemoglobin of blood and blood mixtures by high performance liquid chromatography. *Journal of Forensic Sciences*, n.41, p.804-811, 1996
- Gallardo, J. M.; Sotelo, C.G.; Piñero, C.; Pérez-Martin, R. I. Use of capillary zone electrophoresis for fish species identification. Differentiation of flatfish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.43, p.1238-1244, 1995.
- Lenstra, J.A. DNA methods for identifying plant and animal species in food. *Food authenticity and traceability*. 1.ed. Woodhead Publishing, Cambridge, U.K., p.34-53, 2003.
- Liu, L. Monoclonal Antibody-Based Sandwich Elisa for the Detection of Ovine Muscle in Cooked Meat. 2006. Tese (Master em Nutrition, Food, and Exercise Science) – Universidade do estado da Florida, Florida.
- Liu, Z.J.; Cordes, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, n.238, p.1-37, 2004.
- Lockley, A.K.; Bardsley, R.G. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, n.11, p.67-77, 2000.
- Macías, J.A.G. et al. Identificación del origen de especia animal en carne fresca utilizando inmunodifusión doble. *Técnica pecuaria en México*, Set-Dez, v.38, n.003, 2000.
- Mackie, I. M. et al. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends in Food Science & Technology*, n.10, p.9-14, 1999.
- Mafra. I.; Ferreira. I.; Oliveira. M. Food identification by PCR-based methods. *European Food Research and Technology*, v.3, p.649-665, 1999.
- Meyer, R.; Höfelein. C.; Lüthy, J.; Candrian U. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis : a simple method for species identification in food. AOAC. International symposium. Europe sect. N°4, Nyon , Suisse, vol. 78, n°6, pp. 1542-1551, 1995.

- Moretti, V.M. et al. Traceability issues in fishery and aquaculture products. Veterinary Research Communications, n.27, p.497-505, 2003.
- Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, 15 ed., Washigton D.C., p. 883-889, 1990.
- Quinteiro, J. et al. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. Journal of Agricultural and Food Chemistry, n.46, p.1662-1669, 1998.
- Quinteiro, J. et al. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. Journal of Agriculture and Food Chemistry, n.46, p.1662-1669, 1998.
- Ram, J.L.; Ram, M.L.; Raindoun, F.F. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. Journal of Agricultural and Food Chemistry, n.44, p. 2460-2467, 1996.
- Ramella, M.S.; Kroth, M.A.; Tagliari, C.; Arisi, A.C.M. Optimization of random amplified polymorphic DNA protocol for molecular identification of *Lophius gastrophysus*. Ciencia e Tecnologia dos Alimentos, v.25, n.4, p.733-735, 2005.
- Rasmussen, R.R.; Morrisey, M.T. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. Comprehensive reviews
- Rehbein, H.; Kress, G.; Schmidt, T. Application of PCR-SSCP to species identification of fischery products. Journal of Science of Food and Agriculture, n.74, p. 35-41.
- Sotelo. C.; Piñero. C; Gallardo. J. M. e Pérez-Martín. R. Fish species identification in seafood products. Trends in Food Science and Technology, n.4, p.395-401, 1993.
- Teletchea, F.; Maudet, C.; Hanni, C. Food and forensic molecular identification: update and challenges. Trends in Biotechnology, n.23, v.7, p. 359-366, 2005.
- Toorop, R.M., Murch, S.J.; Ball, R.O. Development of a rapid and accurate method for separation and quantification of myofibrillar proteins in meat. Food Research International, n.30, p.619-627, 1997.
- Wätzig. H.; Dette. C. Capillary electrophoresis (CE)- a review. Strategies for method development and applications related to pharmaceutical and biological sciences. Pharmazie, n.49, p.83-86, 1994.
- Woolfe, M.; Primrose, S. Food forensic: using DNA technology to combat misdescription and fraud. Trends in Biotechnology, n22, v.5, p.222-226, 2004. in food science and food safety, v.7, p.280-295, 2008.

Guilherme de Araújo Marcondes

**PRODUÇÃO DE ANTISSOROS ESPECÍFICOS PARA A DETECÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DE CARNES EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal pela Escola de Veterinária.

Curso: Mestrado em Ciência Animal
Área: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Dra. Prof. Silvana de Vasconcelos Cançado
Co-Orientador: Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2011

M321p Marcondes, Guilherme de Araújo, 1984-
Produção de antissoros específicos para a detecção e identificação de carnes em
alimentos / Guilherme de Araújo Marcondes. – 2011.
39 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado
Co-orientador: Luiz Guilherme Dias Heneine
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Carne – Análise – Teses. 2. Teste imunoenzimático – Teses. 3. Sorodiagnóstico –
Teses. I. Cançado, Silvana de Vasconcelos. II. Heneine, Luiz Guilherme Dias.
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 664.907

Dissertação defendida e aprovada em 21 de junho de 2011, pela Comissão
Examinadora constituída por:

Silvana de P. Cançado
Profª. Silvana de Vasconcelos Cançado
Presidente

Luiz Heneine
Prof. Luiz Guilherme Dias Heneine

Lilian Vianna Teixeira
Profª. Lilian Vianna Teixeira



Universidad de Antioquia. 1984

Investigaciones específicas para la conservación

de la arquitectura histórica.

Universidad de Venezuela. C-

olección Documentos

Universitarios. 1984

Editorial Universitaria. Bogotá - Colombia

Impresión: Imprenta Universitaria. Bogotá - Colombia

Diseño: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Diagramación: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Corrección: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Revisión: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Edición: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Impresión: Imprenta Universitaria. Bogotá - Colombia

Diseño: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Diagramación: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Corrección: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Revisión: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Edición: Gráfica Universitaria. Bogotá - Colombia

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelas oportunidades, pelas vivências, pelas provações que causaram o meu engrandecimento através do aprendizado.

Aos meus pais, Francisco e Iracema, pelo carinho, dedicação, exemplo, paciência e conforto nos momentos de grandes dificuldades.

Aos meus irmãos Marcelo, Viviane e Gustavo, pelo companheirismo e pelos conselhos dados ao longo de minha trajetória.

Aos meus sobrinhos, Pedro e Filipe, pelos momentos de carinho incondicional, momentos de felicidade em dias muitas vezes nublados.

Aos meus cunhados Rodrigo e Ana Izabel, pela presença incontestável durante esta caminhada.

A minha orientadora, Dra. Prof. Silvana de Vasconcelos Cançado e ao meu co-orientador, Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine pela orientação, direcionamento e auxílio em meu projeto.

Aos meus colegas de mestrado e de Laboratório de Imunologia da Fundação Ezequiel Dias, pelos momentos de descontração e pela oportunidade de convívio, amizade e estudo.

Ao Professor Francisco Carlos Faria Lobato, e ao funcionário Nelson Rodrigo da Silva Martins, ambos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, por disponibilizar as amostras de carnes e de soro utilizadas neste estudo.

Ao Cláudio Fonseca de Freitas, responsável pela Fazenda São Judas Tadeu, da FUNED, por de bom grado oferecer os carneiros utilizados neste estudo para imunizações; e ao responsável pela Unidade de Gerenciamento de Amostras da FUNED, Kleber Eduardo da Silva Batisata, por fornecer as amostras de hambúrgueres utilizadas por este estudo.

Agradeço a todos por fazerem parte da construção deste estudo, sem o qual a presença de vocês não seria possível.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 A produção de carne no Brasil	12
2.2 Anticorpos	13
2.3 Antígenos	13
2.4 Imunoensaios	14
2.5 Métodos de Identificação de carnes de diferentes espécies	14
2.5.1 A microscopia óptica clássica	14
2.5.2 Eletroforese e técnicas de focalização isoelétrica	15
2.5.3 Métodos físico-químicos	15
2.5.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (NIRS)	15
2.5.3.2 Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)	16
2.5.4 Métodos moleculares/genéticos	16
2.5.5 Técnicas imunológicas	16
2.5.5.1 Imunodifusão em Gel de Agarose	16
2.5.5.2 Contra-Imunoeletroforese	16
2.5.5.3 Imuncromatografia	17
2.5.5.4 ELISA	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Obtenção de amostras	18
3.2 Tratamento das amostras – Imunização	19
3.3 Obtenção de Anticorpos Específicos	19
3.4 Teste de Especificidade de Anticorpos Anti-espécie	20
3.5 Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres)	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Especificidade de Anticorpos Não-adsorvidos Anti-espécie	21
4.2 Especificidade de Anticorpos Adsorvidos Anti-espécie	23
4.3 Especificidade dos antissoros em diluição seriada	25
4.4 Especificidade dos antissoros adsorvidos frente a diferentes concentrações de抗ígenos homólogos e heterólogos.....	29
4.5 Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres).....	31
4.6 Análise Estatística (Hambúrgueres).....	35
5 CONCLUSÕES.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência do Antígeno de Boi em Marcas de Hambúrgueres	35
Tabela 2	Frequência do Antígeno de Cão em Marcas de Hambúrgueres	36
Tabela 3	Frequência do Antígeno de Cavalo em Marcas de Hambúrgueres	36
Tabela 4	Frequência do Antígeno de Coelho em Marcas de Hambúrgueres	36
Tabela 5	Frequência do Antígeno de Porco em Marcas de Hambúrgueres	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	ELISA. Incubação com antissoro in natura de boi; diluição seriada	21
Gráfico 2	Incubação com antissoro in natura de cão; diluição seriada	22
Gráfico 3	ELISA. Incubação com antissoro in natura de cavalo; diluição seriada	22
Gráfico 4	ELISA. Incubação com antissoro in natura de coelho; diluição seriada	23

Gráfico 5	ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de boi; diluição seriada	24
Gráfico 6	Incubação com adsorvido antissoro de cão; diluição seriada	24
Gráfico 7	ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de cavalo; diluição seriada	25
Gráfico 8	ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de coelho; diluição seriada	25
Gráfico 9	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-boi	26
Gráfico 10	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-cão	27
Gráfico 11	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-cavalo	27
Gráfico 12	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-coelho	28
Gráfico 13	ELISA. Diluição seriada do antissoro Anti-porco.....	28
Gráfico 14	ELISA. Reação do antissoro anti-boi contra os soros homólogos e heterólogos	29
Gráfico 15	ELISA. Reação do antissoro anti-cão contra os soros homólogos e heterólogos	30
Gráfico 16	ELISA. Reação do antissoro anti-cavalo contra os soros homólogos e heterólogos	30
Gráfico 17	ELISA. Reação do antissoro anti-porco contra os soros homólogos e heterólogos	31
Gráfico 18	ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de aves e bovina	32
Gráfico 19	Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de aves, bovina e gordura de suínos.....	32
Gráfico 20	Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carnes de aves, boi e porco.....	33
Gráfico 21	ELISA. Progresso da reatividade do antissoro de porco à medida que se adiciona o soro homólogo à composição de quatro amostras de hambúrguer	34
Gráfico 22	Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de frango	34
Gráfico 23	ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres).Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de frango	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura Geral de um Anticorpo	13
Figura 2	Formatos de ensaios ELISA.....	18

RESUMO

Antissoros espécie-específicos foram produzidos e testados pelo método imunológico de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), com o objetivo de demonstrar a capacidade de se verificar a origem de carnes de diferentes espécies de animais em produtos cárneos processados. Carnes de boi, cão, cavalo e coelho, bem como os soros de boi, cão, cavalo, coelho e porco, foram testados para provar esta imunoafinidade. Também foram realizados ensaios de imunoabsorbância em cinco marcas diferentes de hambúrgueres comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os resultados demonstraram reatividade específica dos antissoros com seus抗ígenos homólogos, todavia, filtrados de músculos aquecidos dos animais reagiram de forma baixa, uma vez que suas proteínas foram altamente desnaturadas devido ao aquecimento. Foi concluído que a metodologia de ELISA apresenta-se eficaz no controle de origem de carnes em produtos cárneos, sendo um método sensível e específico.

Palavras-chave: ELISA, Produtos cárneos, Carnes, imunodiferenciação.

ABSTRACT

Species-specific antisera has been made and tested by ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) method, with the goal of demonstrating the capacity to verify origins of meat from different animal species in processed meat products. Bovine, dog, horse and rabbit meat, as well as bovine, dog, horse, rabbit and pig serum were tested to prove its immunospecificity in immunosorbent assay with five different hamburger products commercialized in the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Results showed specific reactivity of the antisera with its homologous antigens, although heated muscle-tissue extracts of the animals, presented lower reactivity, probably because its proteins were highly denatured by heat. It has been concluded that the ELISA methodology could be applied in the control of meat origin in meat products, being a sensitive and specific method.

Keywords: ELISA, Meat products, Meat, immunodiferenciation.

Capítulo 2 - ADOLESCÊNCIA E JUVENTUDE: PROBLEMAS SOCIAIS

Adolescência é um período de transição entre a infância e a idade adulta, quando o indivíduo se torna mais independente, mais consciente de suas ações e mais capaz de assumir responsabilidade por elas. É uma fase de intensa transformação, tanto física quanto emocional, que marca o final da infância e o início da vida adulta. Muitos adolescentes enfrentam desafios e problemas que podem afetar seu desenvolvimento emocional, social e cognitivo.

2.1. Problemas sociais na adolescência: fatores externos (familiares, escolares, sociais).

2.1.1. Fatores familiares

Problemas familiares são situações que ocorrem dentro de uma família, como separação, divórcio, violência doméstica, abuso, negligéncia, falta de apoio emocional, entre outros. Esses problemas podem ter origem genética, ambiental ou social. A violência doméstica, por exemplo, pode ser causada por fatores como: histórico familiar de violência, pressão social, estresse emocional, entre outros.

2.1.2. Fatores escolares

Problemas escolares são situações que ocorrem dentro de uma escola, como: baixa performance acadêmica, falta de incentivo ao estudo, falta de apoio emocional, entre outros.

2.1.3. Fatores sociais

Problemas sociais são situações que ocorrem na sociedade, como: violência urbana, pobreza, desemprego, entre outros.

2.2. Problemas sociais na adolescência: fatores internos (individuais).

2.2.1. Fatores individuais

Problemas individuais são situações que ocorrem dentro de um indivíduo, como: baixa autoestima, ansiedade, depressão, entre outros.

2.2.2. Fatores cognitivos

Problemas cognitivos são situações que ocorrem dentro da mente de um indivíduo, como: dificuldade de aprendizagem, baixa capacidade de raciocínio, entre outros.

2.2.3. Fatores emocionais

Problemas emocionais são situações que ocorrem dentro das emoções de um indivíduo, como: medo, raiva, tristeza, entre outros.

2.2.4. Fatores comportamentais

Problemas comportamentais são situações que ocorrem dentro do comportamento de um indivíduo, como: agressividade, isolamento social, entre outros.

1 - INTRODUÇÃO

No final dos anos 80 e início dos anos 90, a produção agropecuária internacional sofria com surtos cada vez mais constantes de casos de encefalopatia espongiforme bovina (*Bovine Spongiform Encephalopathy*, BSE), popularmente conhecida como “doença da vaca louca”. Casos foram amplamente divulgados em razão da sua transmissão a pessoas como uma nova variante da doença de Creutzfeldt – Jakob (vDCJ), que é caracterizada como uma doença degenerativa do cérebro, onde o tempo de sobrevida do paciente é de cerca de cinco meses. A doença fatal levou a óbito mais de 150 pessoas e, trouxe à tona a importância da garantia da autenticidade dos alimentos em escala global (Dall' Alba et al., 2004; Nitrini, 2001; Departamento de Saúde do Reino Unido, 2004).

Algumas espécies de carnes possuem restrições sérias ou até mesmo proibições em algumas culturas ou vertentes religiosas. No judaísmo, por exemplo, há uma parte da Torá dedicada à dieta dos seguidores desta religião, designando o termo *Kosher* como um código para os alimentos considerados corretos dentro do judaísmo, e proibindo, por exemplo, o consumo de carne de porco, crustáceos, e a mistura de carnes com leite e derivados, baseado em passagens do velho testamento bíblico. No islamismo, existem três classes destinadas à alimentação: o *Haram*, que é a orientação para alimentos proibidos entre os islâmicos, como o consumo de carne suína, cachorro, gato, cobra, tigre, insetos, animais carnívoros ou pratos preparados com qualquer tipo de sangue; o *Makruh*, código relacionado a alimentos que podem ser consumidos, embora não sejam os alimentos mais recomendáveis, como carne de cavalo entre outros; e o *Halal*, definição dada aos alimentos amplamente permitidos entre os muçulmanos, como carne de carneiro, ovelha, cabra, boi, vaca, frango, galinha, galo, desde que o animal tenha sido abatido seguindo os preceitos da religião islâmica.

O consumo de carnes apresenta questões de cunho social, sendo permitido ou proibido o seu consumo em algumas partes do mundo. Na Ásia, por exemplo, o consumo de carne de cães é bastante comum, porém deve-se ressaltar que é consumida uma raça em particular de cão, e esta raça, que é criada em fazendas específicas, existe

no continente asiático como criação para a indústria alimentícia.

A carne como alimento pode ser definida como todos os tecidos comestíveis de animais de açougue, englobando músculos, com ou sem base óssea, gorduras e vísceras, podendo os mesmos ser *in natura* ou processados, considerando como carnes vermelhas as carnes de bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, suínos, eqüídeos e coelhos; e a carne branca como sendo carne proveniente de aves (galináceos e perus) e peixes (Brasil, 1997; EMBRAPA, acesso em 15 de abril de 2011).

A carne possui composição complexa tendo como principais constituintes proteínas musculares, sangue residual, material colagenoso, lipídios, pequenas quantidades de aminoácidos livres, enzimas, carboidratos e minerais. Ela pode se apresentar de diversas formas (cortada, processada e geralmente preparada a granel), cada uma oferecendo diferentes oportunidades para a adulteração e ou contaminação.

Os produtos de origem animal que foram adulterados, fraudados ou falsificados, segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, Brasil, 1997), são considerados impróprios para consumo, como um todo ou parte. São considerados fraudados os produtos em que tenham sido adicionadas substâncias de qualquer qualidade, espécie e tipo diferentes das de sua composição natural sem prévia autorização do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A adulteração de produtos cárneos não apenas constitui fraudes econômicas, mas também está relacionada com problemas de tabus religiosos, aversões de cunho moral ou alergias a espécies particulares de carne. Desta maneira, a identificação e a diferenciação de carnes das diferentes espécies visam, sobretudo, coibir a possibilidade de fraude e falsificação, quando a carne da espécie animal anunciada é substituída por outra de pior qualidade (Kesmen et al., 2007).

A possibilidade de substituição de carnes de determinados animais por outros na produção de

alimentos levam laboratórios e centros de pesquisa a criarem métodos de diagnóstico relevantes e cada vez mais específicos. Estes mesmos métodos são úteis para a saúde pública e também para discussões de razão ética e religiosa. Há um aumento da comercialização de produtos cárneos industrializados, onde o processo de fabricação altera suas características naturais e, dificulta sua identificação por inspeção visual e sensorial. Kits para exames de procedência de carnes, domésticos e comerciais baseados em ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) ou por reação em cadeia da polimerase (PCR) já se encontram disponíveis para este campo de estudo, mas suas performances ainda não são totalmente conhecidas (CTSCCV, 1997; Méret et al., 1998; Da-Riz & Demeulemester, 1999).

A identificação da espécie animal utilizada em um produto pode ser realizada pelas características morfológicas e físico-organolépticas, sempre que se trata da observação da carne e seus segmentos ou de órgãos e vísceras *in natura*. No entanto, em produtos picados, moídos ou processados é impositivo recorrer a métodos morfológicos, físicos e físico-organolépticos, pois o processo de fabricação altera as características naturais da carne e dificulta sua identificação por inspeção visual e sensorial (Patterson e Jones, 1990).

A cadeia de suprimentos de alimentos moderna é complexa e se amplia diuturnamente. A demanda por garantias de qualidade, segurança e autenticidade exigem a identificação de ingredientes e componentes individuais em alimentos formulados. Os aspectos éticos tais como: práticas específicas de produção (orgânico), tecnológicos (modificação genética), processuais (esterilização) ou religiosos associados à legislação (rotulagem) demandam tecnologias cada vez mais eficientes para monitorar e policiar a autenticidade e rastreabilidade de alimentos.

Com base nestes aspectos os objetivos deste trabalho foram demonstrar, através da metodologia de ELISA, a capacidade de se verificar a origem de carnes de diferentes espécies de animais em produtos cárneos processados.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A produção de carne no Brasil

O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino comercial do mundo e é o maior exportador mundial, além de ser o segundo em produção de equivalente em carcaça, perdendo apenas para os Estados Unidos da América. Aproximadamente 140 países compram a carne bovina brasileira, contudo, o esforço dos produtores brasileiros em relação à divulgação do produto para o mercado exterior é baixo, correndo altos riscos de perda de mercado por parte de países concorrentes em exportações como Argentina e Austrália. Apesar de sua supremacia na tonelagem de carne bovina exportada, o Brasil não exporta para mercados de alto valor agregado, pois, além dos constantes índices de febre aftosa nos rebanhos, a carne bovina brasileira não é considerada por muitos como um produto de alta qualidade. Apesar disso, há um constante debate com relação à qualificação que é dada à carne brasileira pelo mercado internacional (Luchiari Filho, 2006).

Com relação a produção de frango no Brasil, no ano de 2009 foram registradas a criação de 7,297 milhões de toneladas (3,228 bilhões de cabeças) direcionados ao consumo interno, registrando uma alta de 0,15% em relação ao ano anterior. A criação destinada ao mercado externo foi de 3,634 milhões de toneladas (2,02 bilhões de frangos abatidos), representando 33,3% do total produzido no país inteiro. Com relação à posição no ranking mundial de produtores, o Brasil detém o terceiro lugar, estando atrás dos Estados Unidos e China, além de estar em quarto em relação aos maiores consumidores de carne de frango, atrás destes mesmos países e da União Européia, constituindo todos os países formadores do bloco como um grupo único consumidor (UBA, 2009).

A carne suína é a proteína mais consumida no mundo, com uma produção de 115 milhões de toneladas, sendo quase a metade produzida na China e outro terço na União Europeia (UE) e nos Estados Unidos da América (EUA). A participação do Brasil tem crescido em importância no mercado mundial. O País é o quarto maior produtor, com 3% da produção e 11% das exportações. Em relação à sua produção interna, o Brasil tem acompanhado um

crescimento em relação à carne suína, com uma produção, em 2009, de cerca de 3,19 milhões de toneladas (ABIPECS, 2010).

2.2 - Anticorpos

Anticorpos são glicoproteínas (também conhecidas como imunoglobulinas; Ig) que são produzidos por animais vertebrados em resposta à introdução de um agente externo (antígeno), e que possui a habilidade de reconhecer este agente de forma específica e se ligar a ele (Fig. 1). Para se produzir anticorpos é necessário o uso de animais, pelo menos inicialmente (Krebs et al., 2001).

Os anticorpos podem ser produzidos sob o formato de anticorpos monoclonais e policlonais. Anticorpos policlonais são produzidos através das células de defesa do organismo, podendo atuar contra mais de um tipo de antígeno. Estes anticorpos possuem certas desvantagens como, por exemplo: produção limitada, afinidade variável, e vários requisitos para uma extensiva purificação com o objetivo de eliminar uma possível reatividade cruzada. Os anticorpos monoclonais, por sua vez, constituem uma população homogênea de anticorpos produzidos por hibridomas (células “imortalizadas” por um processo de conjugação de uma célula cancerosa com células do baço de um animal previamente imunizado, geralmente linhagens específicas de camundongos). Os monoclonais possuem uma atividade biológica definida, especificidade constante, e produção ilimitada (Hsieh et al., 1998).

Os anticorpos têm sido utilizados no desenvolvimento de imunoensaios destinados a diagnósticos. Para isto torna-se necessário o preparo de anticorpos com especificidade e afinidade desejável. Animais são imunizados com o antígeno e subsequentemente o soro contendo anticorpos policlonais deve ser coletado. Ensaios podem ser aprimorados pelo uso de anticorpos monoclonais, mais específicos que os policlonais. Células do baço também são utilizadas como fonte de DNA em técnicas para produção de anticorpos recombinantes por engenharia genética de células, animais ou bacterianas, enquanto células de animais não imunizados são usadas na tentativa de desenvolver *in vitro* métodos de imunização para

imunogênicos tóxicos (Kohler & Milstein, 1975; McCafferty et al., 1990; Bonwick et al., 1996).

Há vários tipos de classes de anticorpos, por exemplo, imunoglobulinas da classe G (IgG), imunoglobulina que proporciona a principal imunidade baseada em anticorpos contra os patógenos que invadem o corpo. É o único tipo de Ig que o bebê recebe da mãe; imunoglobulinas da classe M (IgM), que eliminam patógenos nos estágios iniciais da imunidade mediada pelas células B; etc. O especialista em estudo de alimentos deve estar atento à classe de anticorpos a serem usados no imunoensaio (Pier et al., 2004; Korpimaki et al., 2003).

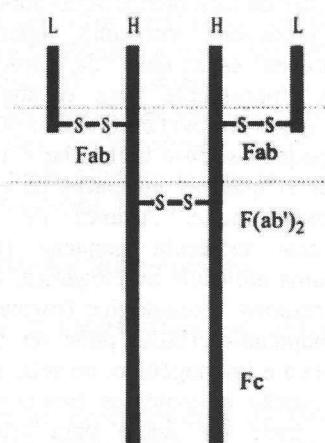


Figura 1: Estrutura geral de um anticorpo. Quatro cadeias de polipeptídeos, duas pesadas (H) e duas leves (L), são estabilizadas e ligadas por pontes dissulfeto (-S-S-) dando à molécula o formato de um Y. A porção inferior da molécula (fração Fc) é própria para ligações. A parte superior [fração F(ab')₂] pode ser subdividida em frações Fab, cada uma possuindo uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Na porção final de cada fração Fab está a região que se liga ao epitopo de um antígeno (Bonwick & Smith, 2004).

2.3 - Antígenos

Antígenos são substâncias capazes, sob condições apropriadas de serem reconhecidas especificamente por anticorpos (Bonwick e Smith, 2004).

A definição original de um antígeno era de uma molécula, com duas propriedades; a habilidade de induzir a formação de anticorpos, e a habilidade de reagir especificamente com estes anticorpos. A definição original foi baseada na observação pelos primeiros imunologistas que notaram que há restrições para os抗ígenos em

demonstrar estas duas propriedades, como por exemplo a influência do tamanho de um antígeno pode ser uma restrição quanto à sua capacidade de induzir uma formação de anticorpos; entretanto estudos posteriores demonstraram que estas duas propriedades podem ser separadas. Isto levou a redefinir os termos para imunogênio, que é uma estrutura molecular capaz de induzir a produção de um ou mais anticorpos, uma vez que um mesmo antígeno pode possuir diferentes epitopos (sítios reativos de um antígeno), com isto induzindo a formação de diferentes anticorpos (Janeway et al., 2004).

Tipicamente, um bom imunogênio deve ter um peso molecular de pelo menos 3000-5000 Da. Os anticorpos produzem, entretanto, ligantes para apenas porções específicas da molécula, o epitopo. A importância para o analista de alimentos é que é possível criar anticorpos contra moléculas pequenas (peso molecular < 1000 Da) que são por si mesmas incapazes de estimular uma resposta imune. Através de ligações químicas uma molécula pequena (hapteno) ligada por uma molécula imunogênica, capaz de criar uma resposta imunológica (carreadora), o complexo hapteno-carreador pode ser formado. Este complexo é imunogênico, ou seja, capaz de gerar uma reação imunológica (imunógeno). O imunógeno pode ser usado para criação de anticorpos, alguns dos quais irão exibir especificidade para pequenos haptens que podem não ser necessariamente imunogênicos. Os anticorpos anti-hapteno então produzidos são capazes de ligarem tanto no hapteno livre ou no hapteno ligado a uma molécula afim ou superfície que apresenta o hapteno na orientação correta para ligação do anticorpo (Liddel e Weeks, 1995).

Em contraste com o restrito grupo de proteínas que possuem atividade de um anticorpo, uma variedade enorme de macromoléculas pode atuar como抗原s: quase todas as proteínas, muitos polissacarídeos, nucleoproteínas, lipoproteínas, polipeptídeos e até mesmo muitas moléculas menores, se sutilemente conjugadas a uma proteína ou polipeptídeo sintético (Tijssen, 1985).

2.4 - Imunoensaios

Os imunoensaios são baseados em medições da ligação de um antígeno com seu anticorpo

correspondente. Originalmente, os imunoensaios foram desenvolvidos para facilitar os estudos em imunologia, particularmente as interações antígeno-anticorpo. Esta habilidade é uma característica de interesse para analistas de alimentos desejosos em realizar análises em matrizes mais complexas (Gosling, 2000). Atualmente, encontram aplicações em diversas áreas de pesquisa e diagnóstico.

Imunoensaios podem ser realizados com o auxílio de anticorpos tanto policlonais como monoclonais. Anticorpos policlonais são adquiridos através da imunização de animais, com抗原s contra os quais se deseja obter anticorpos. Apesar de anticorpos policlonais serem amplamente utilizados em diferentes tipos de imunoensaios, sua especificidade é baixa, podendo comprometer o desempenho dos imunoensaios. O ideal seria a produção de anticorpos monoclonais, mais específicos; porém sua produção é mais difícil, uma vez que requer técnicas de cultivo celular para o cultivo de hibridomas (tumores associados a tecido hepático de camundongos), que devem ser mantidos sempre em um ambiente altamente asséptico e em condições de temperatura e gases do ambiente ideais para a sua manutenção. Uma vez obtidos com sucesso, a produção de anticorpos é ilimitada e sempre com alta especificidade.

2.5 - Métodos de Identificação de carnes de diferentes espécies

Existem na literatura revisões que discorrem sobre os vários métodos de identificação de carnes e seus pontos positivos e negativos (Patterson e Jones, 1990; Gizzi et al., 2003).

2.5.1 - A microscopia óptica clássica

Constitui o único método oficial para a detecção de PAP's (Proteínas Animais Processadas) na União Europeia (Diretiva da Comissão 2003/126/EC). A análise tem dois objetivos que são: a detecção de constituintes de origem animal e a detecção de proteínas de animais terrestres em alimentos de peixe. Técnicas de microscopia possuem limitações, pois dependem da experiência do observador, e da presença de algumas partículas, como: fibras musculares, ossos, pêlos, penas etc, para permitir a identificação. Outra restrição é seu emprego para

a identificação espécie-específica de carnes de diferentes origens presentes no mesmo alimento. Estudos colaborativos demonstraram bons resultados da microscopia na averiguação de produtos cárneos, embora a falta de harmonização no processo de preparo das amostras possa ser a causa de resultados discrepantes (Gizzi et al 2003; Veys et al., 2007; van Raamsdonk et al., 2008).

A microscopia de infravermelho usa o espectro infravermelho de partículas individuais na amostra para discriminar a origem dos componentes do alimento. O preparo da amostra segue o protocolo da microscopia óptica e equipamentos mais modernos permitem a análise de várias amostras simultaneamente, embora devido à superposição de espectros de grupos de animais diferentes a identificação exata da espécie pode ser apenas sugerida (Fumiére et al., 2009).

2.5.2 - Eletroforese e técnicas de focalização isoelétrica

Métodos eletroforéticos consistem na separação de proteínas em um campo elétrico após sua extração do tecido muscular e em seguida depositados em um meio específico. A separação das proteínas por eletroforese podem ser conduzidas em géis compostos por poliacrilamida (PAGE), contendo ou não, um agente desnaturante de proteínas (como por exemplo o sulfato-dodecil de sódio, SDS-PAGE) ou por métodos de focalização isoelétrica (IEF) em um gel de Agar ou de poliacrilamida (PAGIF). O método IEF consiste na separação em um gel com um gradiente de pH, onde proteínas individualizadas (separadas por algum agente desnaturante) se deslocam pelo gel de acordo com seu ponto isoelétrico. No caso do PAGE, este é considerado como o teste na sua forma mais simples, onde a corrida das proteínas no gel ocorre sem a adição de qualquer agente desnaturante. A separação das proteínas depende de sua carga elétrica nativa e do tamanho das mesmas. No caso do SDS-PAGE, as proteínas são tratadas para adquirirem carga negativa similar e a separação se dá em função do seu peso molecular. Com isto, há uma correlação linear entre a distância percorrida pelas proteínas e o valor logarítmico do peso molecular, possibilitando determinar o peso molecular das

amostras, referenciando-as a um padrão (Monstowska e Pospiech, 2007).

Técnicas eletroforéticas e de focalização isoelétrica mostraram bons resultados para a identificação de espécies únicas de carnes não processadas e cruas. A focalização isoelétrica de mioglobulinas e de isoenzimas com espécie-especificidade foi capaz de discriminar diferentes espécies de carnes. Contudo, as técnicas eletroforéticas são imprecisas quando mais de uma espécie de carne está presente na amostra. Quando a carne está cozida, é necessário um longo processo de extração das proteínas com agentes solubilizantes, diálise e concentração. Embora seja possível identificar espécies de carnes de amostras cozidas os longos processos de preparo da amostra e sua pouca aplicabilidade na análise de misturas e de alimentos processados torna estas técnicas mais aplicáveis como testes confirmatórios, após o uso de técnicas mais simples como as imunológicas (Patterson e Jones, 1990).

2.5.3 - Métodos físico-químicos

2.5.3.1 - Espectroscopia de Infravermelho (NIRS)

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho (NIRS) tem como princípio o espectro de absorbância eletromagnética que ocorre na região perto do infravermelho, definida como os comprimentos de onda entre 780 e 2526 nm. As bandas de absorção são produzidas por moléculas específicas nas amostras analisadas. O NIRS foi utilizado para determinar a composição química de peito e coxa de aves (Berzaghi et al., 2005; Cozzolino et al., 1996), para a diferenciação de carne de bovinos fresca e congelada (Downey e Beuchêne 1997a, 1997b; Thyholt e Isaksson, 1970), e para a discriminação de espécies de carne (Rannou e Downey 1997; McElhinney et al., 1999; Ding et al., 1999; Downey et al., 2000).

O NIRS, uma das técnicas mais utilizadas na indústria de alimentos, é rápida, não utiliza reagentes perigosos, precisa de pequenas quantidades de amostra e tem resultados reproduzíveis. Por outro lado, é um método indireto que precisa de uma grande série de resultados de amostras certificadas para a formação de um padrão de referência e formaç

de um modelo de calibração. Precisa ainda de experiência profissional para o processamento e análise dos dados, além de ser um equipamento caro. A sensibilidade e a precisão precisam ser melhoradas para a obtenção de resultados confiáveis. Estas limitações dificultam a utilização desta técnica na análise de rotina de espécies de carne. (Fumiére et al., 2009).

2.5.3.2 - Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC)

Vários métodos de cromatografia líquida foram descritos para a identificação de espécies de carne. Tinbergen et al., (1976) descreveram a aplicação da técnica para a detecção de carne de galinha. A diferença da relação das concentrações de anserina e carnosina (a/c) presente em diversos músculos esqueléticos de suínos, bovinos e aves foi usado como medida de diferenciação. Foi possível detectar até 5% de carne de ave nas carnes de suínos cozidas e cruas. Carnegie et al., (1985) também utilizaram a diferença entre a relação de a/c para desenvolver um método de HPLC para detectar carne de ovinos, equinos e canguru em produtos cozidos. Saeed e outros (1988) utilizaram a técnica para diferenciar carne de porco de outras espécies.

2.5.4 - Métodos moleculares/genéticos

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) consiste no método de criação de várias cópias de um fragmento de DNA (amplificação) para a identificação e seqüenciamento de genes de um determinado organismo, sendo atualmente a técnica de escolha. Vários trabalhos já demonstraram sua sensibilidade e especificidade. Dentre as limitações está a necessidade de obter amostras com o material genético íntegro, isto é, em condições de ser amplificado. O processamento da carne a altas temperaturas é um complicador, uma vez que pode ocorrer fragmentação do DNA. O método necessita de uma etapa de extração para isolar os ácidos nucléicos ainda presentes na amostra. Fragmentos curtos de DNA não são extraídos com a mesma eficiência de fragmentos maiores de DNA. Num estudo inter-laboratorial, a maioria das técnicas de PCR falharam em termos de sensibilidade e especificidade (Gizzi et al., 2003).

Em estudo publicado por Prado et al. (2007), três métodos de Real Time PCR foram avaliados para a identificação de espécies animais em alimentos. Os resultados mostraram que todos os testes detectaram até 0.1% de contaminação de amostras de bovinos em alimentos mesmo quando misturadas a amostras de outras espécies. Uma importante limitação do teste para testar carnes é que amostras de DNA podem estar presentes em outros constituintes do animal tais como: leite, sangue, gordura, proteínas, peles e ovos. Isto pode impedir que o teste seja aceito para a identificação de carnes. Bellorini et al. (2005) mostraram que a gordura de ruminantes pode ser identificada como resultado falso positivo quanto à presença de carne em produtos cárneos à base de outros animais.

2.5.5 - Técnicas imunológicas

Técnicas Imunológicas são procedimentos fundamentados na interação específica do antígeno com o anticorpo podendo ser aplicado a misturas complexas de alimentos sem uma prévia separação de seus constituintes (Patterson e Jones, 1990).

2.5.5.1 – Imunodifusão em Gel de Agarose

A imunodifusão em Gel de Agarose ou teste de Ouchterlony consiste em um procedimento simples em uma placa de agarose, onde através de difusão, o anticorpo, se desloca pelo gel, entrando em contato com os抗ígenos. A ligação antígeno-anticorpo é visualizada através de uma fina linha opaca de precipitação (Swart e Wilks, 1982).

A imunodifusão em gel já foi utilizada para a identificação de diversas espécies, como bovino, equinos, suínos, aves, ovinos e canguru. Um kit, o *Domino 5* foi disponibilizado comercialmente. A técnica de imunodifusão embora específica tem baixa sensibilidade, variando entre 2% a 20% dependendo das espécies analisada (Patterson e Jones, 1990).

2.5.5.2 – Contra-Imunoelétroforese

A contra-imunoelétroforese é mais rápida e sensível do que a imunodifusão em gel, e como essa, é também limitada pelos antissoros específicos existentes. Outra limitação é a

diferenciação entre espécies próximas que depende de aparelhos mais sofisticados e de um maior grau de informação do técnico. Entretanto, quando se tem pouca amostra e níveis baixos de adulteração, é uma boa técnica tanto para amostras cruas ou cozidas, desde que haja o reconhecimento de epitopos lineares. Ensaios com anticorpos monoclonais específicos para aves, eqüinos e suínos foram desenvolvidos para a identificação da espécie de carnes. É um método sensível e rápido e pode distinguir entre espécies próximas. Contudo, depende também da obtenção de anticorpos específicos, que podem ser policlonais ou monoclonais. Uma vantagem do método é a possibilidade de ser aplicável tanto a amostras complexas “in natura” quanto processadas e ou aquecidas (Martin et al., 1988c, García et al., 1994, Morales et al., 1994, Billett et al., 1996).

Hsieh et al. (1998) produziram um anticorpo monoclonal capaz de diferenciar carnes cozidas (100 °C por 15 minutos) de bovinos, ovinos, equinos e cervídeos e de algumas espécies de aves (galinha, peru e pato) e sugeriram o uso deste anticorpo em ensaios de ELISA como um teste de triagem de alimentos. Kim et al., em 2005, publicaram um estudo onde o ELISA desenvolvido com anticorpos monoclonais foi capaz de diferenciar carne bovina de outras espécies utilizados na composição em alimentos comerciais, alimentos estes autoclavados e na proporção de 0.05% de contaminação.

2.5.5.3 – Imunocromatografia

Outro teste imunológico é a imunocromatografia de difusão lateral (*dip-stick*). O método consiste na interação antígeno-anticorpo, onde o grau de ligação é verificado através da visualização de uma banda, em caso positivo, além da visualização de uma banda-controle. Kits comerciais foram testados para a identificação de carnes e mostraram resultados variáveis. Sensibilidade de até 0,1% foi alcançada por alguns kits enquanto outros não chegaram a 0,5%. Quanto à especificidade, os valores falsos variaram de 30% a 50% em razão do tipo de amostra. Carnes de alimentos com gordura ou tecido conjuntivo foram responsáveis por resultados falso-positivos (Ayob & Smith, 1990).

Num estudo publicado por Myers et al., em 2005, o kit *Reveal* mostrou ótima especificidade,

mas não atingiu a sensibilidade desejada de identificar 0,1% de contaminação. No mesmo estudo outro kit, o *Feedcheck*, mostrou boa sensibilidade chegando ao nível de 0,1%, mas obteve resultados muito ruins quanto à especificidade com resultados falso-positivos acima de 30%.

2.5.5.4 - ELISA

O método de ELISA tornou-se o imunoensaio principal entre muitos ensaios modernos utilizados atualmente. Essencialmente, o ELISA depende da imobilização de um a dois componentes, tanto antígeno quanto anticorpo, em uma superfície sólida. Neste método ocorre uma reação entre o componente ligado e o não-ligado, que pode ser um antígeno ou um anticorpo, que são fixados em uma superfície sólida e a simples remoção dos componentes não-ligantes por lavagem deixa os reagentes ligados em um formato de fácil medição. Esta medição apresentava uma dificuldade para quantificar o grau de ligações antígeno-anticorpo e foi superada pelo método de identificação através de um anticorpo ligado à uma enzima. O anticorpo identificado pode facilmente detectado fornecendo um substrato apropriado que reage à enzima a ser convertida. Essa conversão resulta em uma mudança detectável ou na liberação de íons, que reagem com um outro reagente, mudando visivelmente a cor do substrato (Bonwick e Smith, 2004).

O uso de antígenos (ELISA indireto), bem como de anticorpos (ELISA direto) imobilizados em uma placa fornece uma gama de formatos para o ensaio (Fig. 2). A forma mais simples do ELISA é o formato direto de captura do anticorpo, onde o antígeno é ligado a uma superfície sólida e um anticorpo específico, ligado a uma enzima, é responsável por ligá-lo. Após lavagem para remoção dos materiais não-ligantes a solução de substrato é adicionada, em que haverá reação com a enzima previamente marcada e o resultado é um produto corado. O grau de formação do produto corado, que representa a quantidade de ligação entre os anticorpos e os抗ígenos pode ser determinado através do uso de um espectrofotômetro. Se as amostras de anticorpos forem misturadas previamente com uma solução contendo o antígeno homólogo, como por exemplo um extrato cárneo, ocorrerá uma redução na quantidade de anticorpos ligantes à

superfície sólida (Bonwick e Smith, 2004; Asensio et al., 2008).

O método de ELISA competitivo direto baseado na captura de anticorpos depende de um número de fatores. Primeiro: a disponibilidade de抗ígenos autênticos para aderir à superfície sólida; segundo, o抗ígeno deve possuir uma molécula extensa, promovendo com isto uma aderência tanto do抗ígeno à superfície sólida como ao seu anticorpo homólogo; e terceiro, o anticorpo deve reconhecer os抗ígenos tanto ligantes como não ligantes com igual eficiência (Bonwinck & Smith, 2004).

Wittaker et al. (1983) foram os pioneiros no uso do ELISA como um imunoensaio na detecção de origem de carnes, onde foram testadas carnes não-processadas de bovino, ovino, eqüino, canguru, porco e camelo. O estudo em questão tinha como objetivo testar a eficiência do ELISA em comparação com outro método imunológico bastante realizado na época, que era a imunodifusão em gel de agarose ou Teste de Ouchterlony. Os autores demonstraram que o ELISA possuía mais vantagens em relação à imunodifusão, como a capacidade de ser mais rápido, levando cerca de 3 horas; requerer menor volume de antissoros para a realização dos ensaios; os antissoros poderiam ser misturados, sem com isto comprometer sua capacidade de ligação e especificidade; a capacidade do ELISA possuir um procedimento semi-automático, diminuindo consideravelmente erros humanos provocados com frequência nestes ensaios e um aumento considerável na sensibilidade, onde no estudo em questão puderam detectar até 1 mg de fraude.

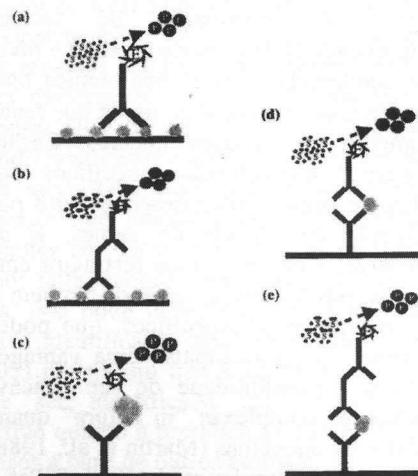


Figura 2: Formatos de ensaios ELISA. (a) ELISA direto (captura do anticorpo); (b) ELISA indireto (captura do anticorpo): assim como em (a), porém com um anticorpo específico previamente marcado, permite o uso de anticorpos anti-espécie comercializados; (c) ELISA direto (captura do抗ígeno): permite uma competitividade adicionando um抗ígeno livre e assim bloqueando os sítios reativos com um ligante marcado; (d) ELISA "sanduíche" direto: o抗ígeno é capturado por um anticorpo imobilizado à placa e detectado por um segundo抗ígeno marcado; e (e) ELISA "sanduíche" indireto: o抗ígeno é capturado por um anticorpo imobilizado à placa e a ligação ao segundo anticorpo é detectada por um terceiro anticorpo marcado. Assim como em (b), é permitido o uso de anticorpos anti-espécie marcados comercializados (Bonwick & Smith, 2004).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Obtenção de amostras

Amostras de soros de diferentes espécies animais (bovinos, caninos, eqüinos, coelhos e suínos) foram cedidas pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Todas as amostras eram de animais perfeitamente saudáveis e em idade adulta. As amostras foram utilizadas como fonte de抗ígenos para os imunoensaios a serem realizados durante a fase experimental do trabalho.

As amostras foram separadas em alíquotas de 1 ml cada, submetidas a congelação em freezer a -20°C e foram descongeladas apenas no momento do uso.

Amostras de músculos de diferentes espécies animais (bovinos, caninos, eqüinos e coelhos) foram cedidas pela mesma instituição. Da mesma forma que os soros, todas as amostras cárneas foram obtidas de animais em condições perfeitas de saúde. As amostras de carnes também foram utilizadas com o objetivo de obtenção de proteínas cárneas para os imunoensaios.

Para a produção de extratos musculares, as amostras de carnes foram trituradas e misturadas a uma solução de Tampão Salino-Fosfato (PBS) 0,1 M pH 7,4 até a obtenção de um composto homogêneo e, em seguida, foram dispostas em placas de vidro e aquecidas em uma estufa a 60°C *overnight* para sua devida secagem. Após a secagem, as amostras foram novamente trituradas e misturadas em solução PBS 0,1 M pH 7,4, filtradas com filtro de papel qualitativo Whatman nº4 (Fisher Scientific, NJ). Após estes procedimentos foram realizados ensaios de dosagem de proteínas e obteve-se um filtrado homogêneo e cristalino, onde em seguida foram separados em aliquotas de 1 ml cada e armazenados em freezer a -20°C até o momento do uso.

3.2 - Tratamento das amostras – Imunização

Para imunização foram utilizados 9 (nove) carneiros em idade adulta, cada um para um tipo de antígeno a ser inoculado, concedidos pela Fazenda São Judas Tadeu, (Fazenda experimental da Fundação Ezequiel Dias, localizada em Betim, MG, Brasil).

Para imunização, os soros e filtrados de músculos previamente descritos foram homogeneizados em adjuvante de Freund completo na proporção de 1:1 (uma parte de adjuvante para uma de soro ou filtrado de músculo). O adjuvante de Freund possui como princípio a lenta liberação da carga antigênica no animal a ser experimentado, com o objetivo de se obter grandes quantidades de anticorpos específicos.

Realizado a homogeneização, os抗ígenos foram inoculados nos carneiros com o auxílio de seringas de vidro, em doses de 2 ml. As inoculações dos soros e filtrados foram realizadas num intervalo de tempo de 15 dias entre uma e outra, totalizando quatro inoculações. Antes de cada inoculação retirava-

se cerca de 10 mL de sangue de cada carneiro e 14 dias após a última inoculação realizou-se a coleta de 200 mL de sangue de cada um dos animais. O sangue coletado foi coagulado e submetido à centrifugação a 10000 g por trinta minutos para a retirada do soro, armazenado em freezer a -20°C.

3.3 - Obtenção de Anticorpos Específicos

Para a produção de anticorpos específicos, os procedimentos aqui descritos foram adaptados de Avarameas e Ternynck (1969). Foram preparadas colunas de imunoafinidade (Colunas contendo抗ígenos, para posterior ligação com anticorpos) com o objetivo de aumentar a especificidade dos antissoros removendo os anticorpos com reatividade cruzada com os抗ígenos heterólogos. Para isso, os géis de especificidade foram preparados misturando todos os抗ígenos, exceto o específico desejado (soro homólogo), com albumina 1 mg/mL e glutaraldeído a 2,5%. Após incubação por uma hora, sem agitação, em temperatura ambiente ocorreu a formação do gel. O gel, foi triturado com uma espátula lavada em PBS 0,1 M pH 7,4 até a formação de partículas minúsculas. Em seguida as partículas foram centrifugadas para descartar o sobrenadante. Este processo foi repetido três vezes até a obtenção de partículas menores e consistência pastosa. Após a centrifugação, o gel foi misturado com HCl-Glicina 0,2 M e pH 2,8 por cerca de 10 minutos. Após outra centrifugação, o pH foi ajustado para pH 7,0 com K₂PHO₄ 1 molar e lavado três vezes com água destilada. Bloqueou-se os sítios reativos restantes com Etanolamina, 0,1 M pH 8,0 em incubação *overnight* a 4°C e em seguida lavado novamente com PBS 0,1 M. Feito isto, os géis foram separados em colunas distintas e armazenados imersos em Tampão de Azida Sódica 0,01 M, que possui atividade bacteriostática, impedindo a contaminação por microrganismos.

Para a adsorção dos antissoros, as colunas foram novamente lavadas com PBS 0,1 M até a retirada total da Azida Sódica remanescente. Os antissoros foram diluídos na proporção 1:3 com tampão PBS e foram passadas pelas colunas heterólogas (colunas que não continham o抗ígeno específico para o antissoro sendo adsorvido). Por exemplo: o antissoro de boi foi adsorvido em uma coluna na qual soro ou

proteínas de músculo de boi, não estavam presentes. Assim, os anticorpos no soro anti-boi com reatividade cruzada para os抗ígenos das outras espécies de carne presentes no adsorvente, foram retidos e somente os anticorpos específicos para boi foram coletados. O soro adsorvido era armazenado em tubos Falcon de 15 mL. Para ter certeza de que todos os anticorpos foram coletados, foram realizadas periodicamente dosagem das proteínas.

3.4 - Teste de Especificidade de Anticorpos Anti-espécie

Os testes de especificidades foram realizados através do método de ELISA indireto, utilizando-se microplacas de 96 poços fundo reto, marca Costar®. Todos os ensaios de ELISA foram realizados em duplicata.

Para os ensaios em leitor de ELISA, cada uma das amostras foi aliquotada em tampão de sensibilização pH 9,6 e distribuídos entre os poços nas concentrações de 10,0; 1,0; 0,1 e 0,01 µg por poço. A cada poço foram acrescentados 100 µL da amostra e as microplacas incubadas *overnight*, cobertas com papel alumínio a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução de lavagem (NaCl + 5% Tween 20) e foi acrescentado em cada poço 100 µL de solução de bloqueio (Caseína 2%). Após estes procedimentos, as placas foram incubadas por uma hora a 37°C e lavadas em seguida.

Os antissoros adsorvidos ou antissoros não adsorvidos foram então diluídos em solução tampão de incubação (PBS 0,1 M com Tween 20, 0,05%) na proporção de 1:25 e adicionados às microplacas, sendo em seguida incubadas novamente durante uma hora a uma temperatura de 37°C. Novamente a placas foram lavadas.

Após a incubação, os poços foram preenchidos com conjugado anti-sheep 1:10000 (Sigma®), diluído em Caseína 2% e levado a estufa por mais uma hora. Em seguida, a microplaca foi lavada e preenchida com 100 µL cada poço com solução de substrato (Tampão Citrato pH 5,5 0,15M com 5 mg de OPD mais 5 µL de H₂O₂). A microplaca foi novamente incubada a 37 °C durante 20 minutos, para o desenvolvimento da cor. A reação foi interrompida adicionando-se H₂SO₄, 30% e a intensidade da cor foi medida em leitor de ELISA a 492 nm.

Para ensaios de eficiência dos anticorpos, a sensibilização se deu na concentração de 10 µg/mL (1 µg/poço) e a incubação se deu em diluições seriadas dos antissoros nas proporções 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80.

Além destes ensaios, foram realizados experimentos para testar a eficiência dos antissoros antes e após as adsorções nas colunas de imunoafinidade (antissoros não-adsorvidos e antissoros adsorvidos três vezes nas colunas de imunoafinidade). As proporções dos antissoros utilizados na fase de incubação da placa foram 1:50, 1:100, 1:200 e 1:400. Em todos os resultados, aos valores eram subtraídos dos obtidos pelo controle (soro de carneiro pré-imunizado) realizando com isto um *cut-off* (corte).

3.5 - Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres)

Seis amostras de seis lotes de cinco marcas de hambúrgueres foram adquiridas em supermercados da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Para o uso destas amostras, cerca de 5 gramas de cada uma foram trituradas dentro de Tubos Falcon® de 15 mL contendo solução salina durante uma hora, até a obtenção de uma mistura homogênea. Após este processo as amostras foram deixadas em repouso para decantação das partículas sólidas, centrifugadas a 10000 RPM e filtradas em filtros de papel Whatman nº 4 (Fisher Scientific, NJ) até a obtenção de um filtrado cristalino. Em seguida, foi realizada a dosagem de proteínas totais através da absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro. Após a dosagem as amostras foram aliquotadas e preservadas em um freezer -18°C até o momento de uso. Os hambúrgueres foram separados em cinco grupos (Grupos G1, G2, G3, G4 e G5), de acordo com a composição de cada uma das marcas de hambúrgueres analisadas; cada grupo tendo como representantes seus lotes numerados de 01 a 06. As análises estatísticas foram realizadas com o software SAEG 9.1 e realizadas análises estatística-descritivas.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Especificidade de Anticorpos Não-adsorvidos Anti-espécie

É importante ressaltar que os antissoros utilizados nesta etapa da pesquisa não foram ainda purificados em colunas de imunoafinidade. O antissoro de porco não foi utilizado nesta modalidade de ensaio pelo fato de no período de realização destes experimentos o mesmo ainda não ter sido obtido.

O gráfico 1 demonstra as reações de afinidade com o antissoro não-adsorvido de bovino e as outras espécies testadas. É possível notar através dos resultados apresentados que tanto o soro

quanto o filtrado do músculo de boi reagiram de forma específica com o antissoro de boi, enquanto os demais抗ígenos demonstraram pouca reatividade. Todos os demais抗ígenos, com exceção do soro de coelho, obtiveram um mesmo padrão baixo de reatividade, mas mesmo o soro de coelho apresentou menor reatividade em relação ao soro de boi e filtrado de músculo bovino, apesar de se apresentar numa leitura próxima da apresentada no músculo bovino. Apesar do antissoro anti-boi não ter sido filtrado na coluna de imunoafinidade, ainda assim observa-se maior especificidade com seus抗ígenos homólogos, no caso o soro e o filtrado do músculo de boi.

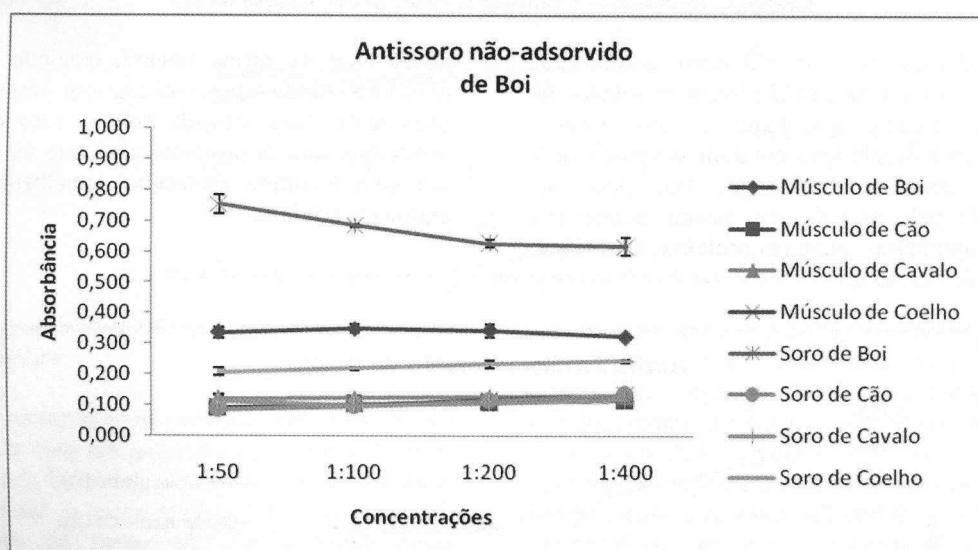


Gráfico 1: ELISA. Incubação com antissoro in natura de boi; diluição seriada.

No gráfico 2 são apresentados os resultados de afinidade com o antissoro de cão. Neste resultado, foi observado que, apesar do antissoro de cão reagir com o soro homólogo, houve também reatividade cruzada em relação ao soro de boi. A explicação para esta alta reatividade com o soro de boi seria a presença de epitopos

comuns presente nos soros das espécies de cão e boi. Com relação ao músculo de cão, o mesmo apresentou reatividade na mesma faixa de intensidade dos demais抗ígenos heterólogos, mostrando com isto pouca especificidade com o anti-cão.

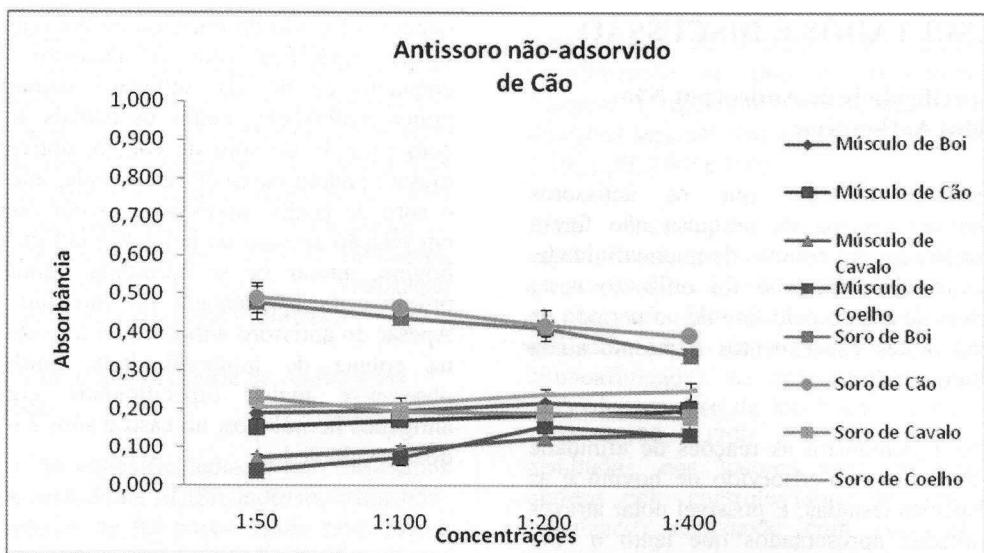


Gráfico 2: Incubação com antissoro *in natura* de cão; diluição seriada.

Os resultados com o antissoro equino são apresentados no gráfico 3. Neste resultado, foi possível observar que tanto o soro como o filtrado do músculo apresentaram alta reatividade com o antissoro homólogo. Isto pode ser explicado pelo fato de que mesmo aquecida a altas temperaturas, algumas proteínas específicas à carne de cavalo se

apresentam de forma íntegra, reagindo com o antissoro. Ainda é possível registrar neste ensaio uma reatividade cruzada com o soro de boi, mostrando que há proteínas presentes no soro de boi com estrutura molecular semelhante entre equinos e bovinos.

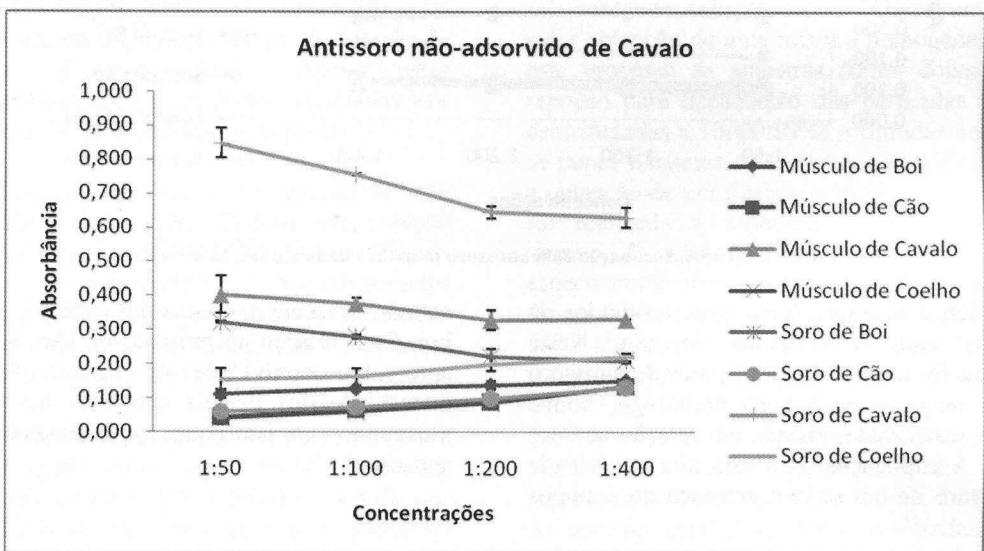


Gráfico 3:ELISA. Incubação com antissoro *in natura* de cavalo; diluição seriada.

Novamente foi observado uma maior especificidade do antissoro de coelho com seus抗ígenos homólogos (gráfico 4). Observa-se também uma reatividade cruzada do antissoro de coelho com os抗ígenos dos soros de boi e

cavalo. Uma explicação para isso seria que ainda há anticorpos que reagem de forma inespecífica com proteínas semelhantes às de coelho presentes no soro de cavalo e boi, ocorrendo uma reação cruzada. Quanto ao músculo de coelho,

era esperado uma maior reatividade frente ao antissoro de coelho. Esta reatividade não foi apresentada e uma possível explicação seria a desnaturação de suas proteínas após o tratamento térmico. A reatividade cruzada apresentada nestes resultados (gráficos 1 a 4) mostra a importância da adsorção dos antissoros para se

obter anticorpos mais específicos e com isto reduzir a inespecificidade do ensaio de identificação de diferentes tipos de carnes em produtos cárneos. Esta adsorção proporcionará também maior segurança quanto à exatidão do resultado de identificação.

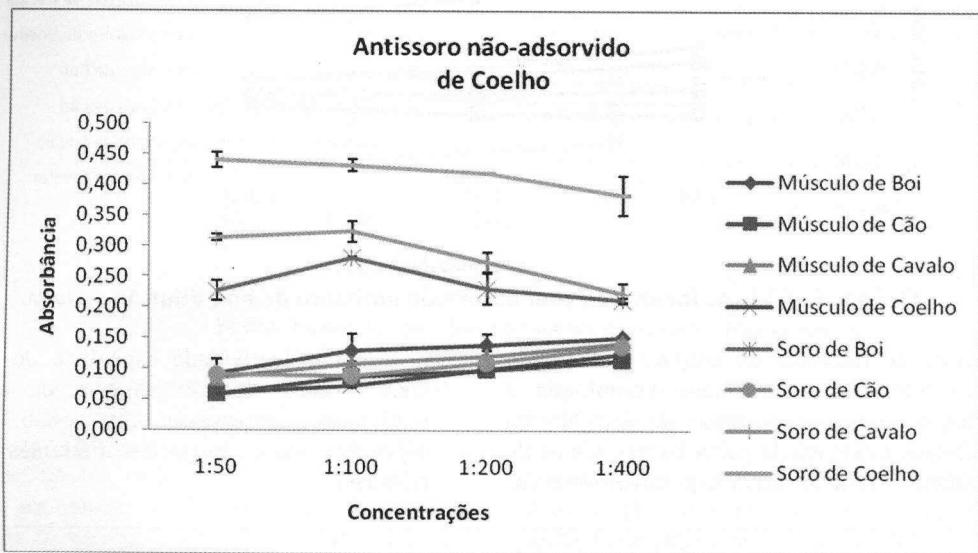


Gráfico 4: ELISA. Incubação com antissoro *in natura* de coelho; diluição seriada.

4.2 - Especificidade de Anticorpos Adsorvidos Anti-espécie

Cada microplaca de ensaios em ELISA foi incubada com um antissoro adsorvido diferente, e em cada linha da placa um antígeno diferente, para testar a especificidade do adsorvido. O antissoro de porco não foi utilizado nesta modalidade de ensaio. Da mesma forma que nos ensaios anteriores, o mesmo não havia sido obtido durante esta parte do experimento.

No gráfico 5, observa-se o resultado referente à reação do antissoro de boi (adsorvido

três vezes) com os抗ígenos homólogos e heterólogos. A maior reatividade do antissoro é contra seus抗ígenos homólogos. Evidencia-se um distanciamento entre a reatividade específica e a reatividade cruzada com os抗ígenos heterólogos. Após a passagem do antissoro anti-boi pela coluna de imunoafinidade, os anticorpos inespecíficos ficaram retidos, aderidos aos抗ígenos heterólogos presentes na coluna de glutaraldeído. Como resultado, observa-se uma maior especificidade do antissoro adsorvido em relação aos seus homólogos quando comparado aos抗ígenos heterólogos.

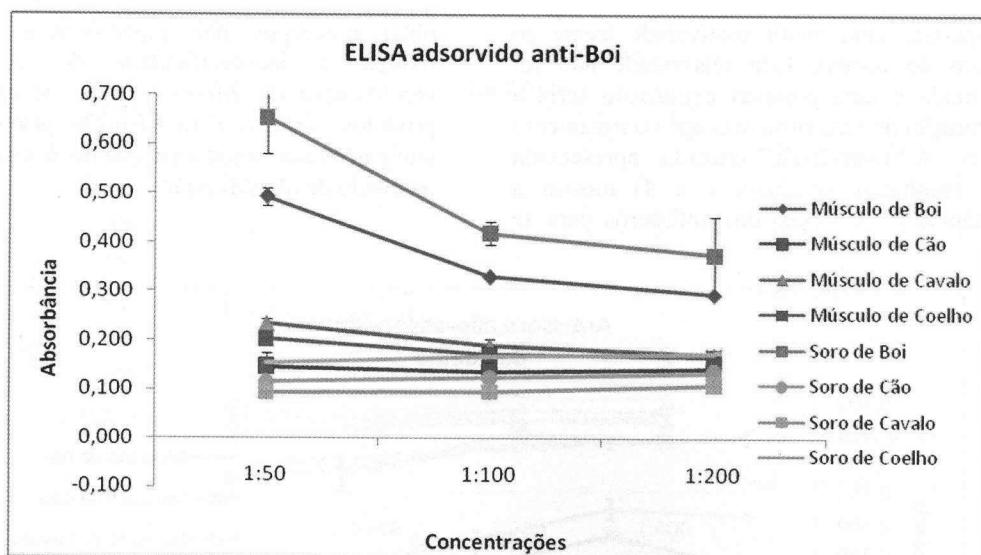


Gráfico 5: ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de boi; diluição seriada.

No gráfico 6, referente ao antissoro adsorvido anti-cão em relação aos seus homólogos e heterólogos, observa-se uma diminuição da sensibilidade evidenciada pelos baixos níveis de absorbância. Contudo ainda é possível observar

uma maior reatividade específica do antissoro com o soro de cão. Apesar da queda na reatividade, observa-se uma estabilidade da especificidade ao longo das diferentes diluições testadas.

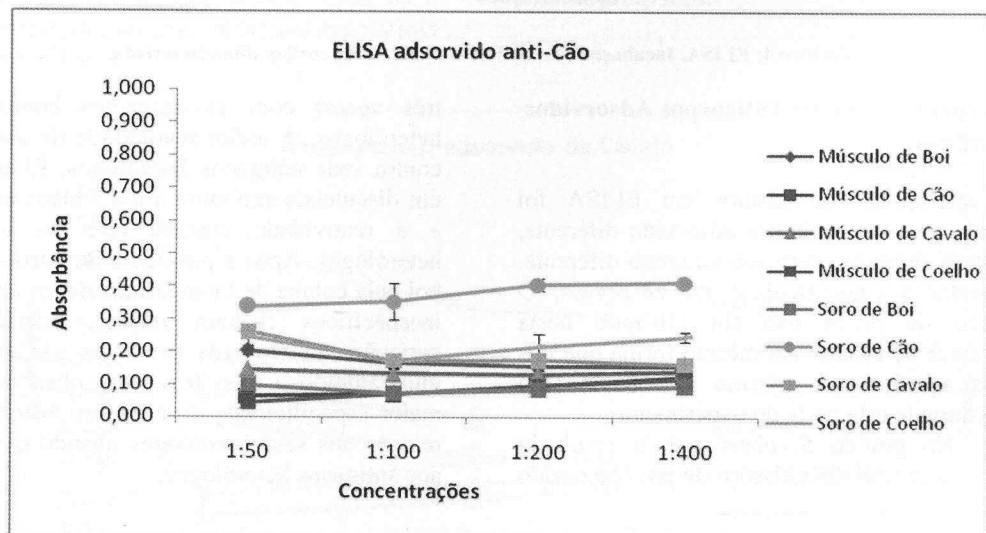


Gráfico 6: ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de cão; diluição seriada.

No gráfico 7, que representa a reatividade do antissoro (adsorvido três vezes) de cavalo com抗ígenos homólogos e heterólogos, o antissoro de cavalo apresentou alta especificidade, reagindo de forma específica tanto com o soro

quanto com o filtrado de músculo homólogo. Para este antissoro, a especificidade adquirida não diminuiu a afinidade, evidenciada pela alta reatividade específica mesmo na maior diluição (1:400).

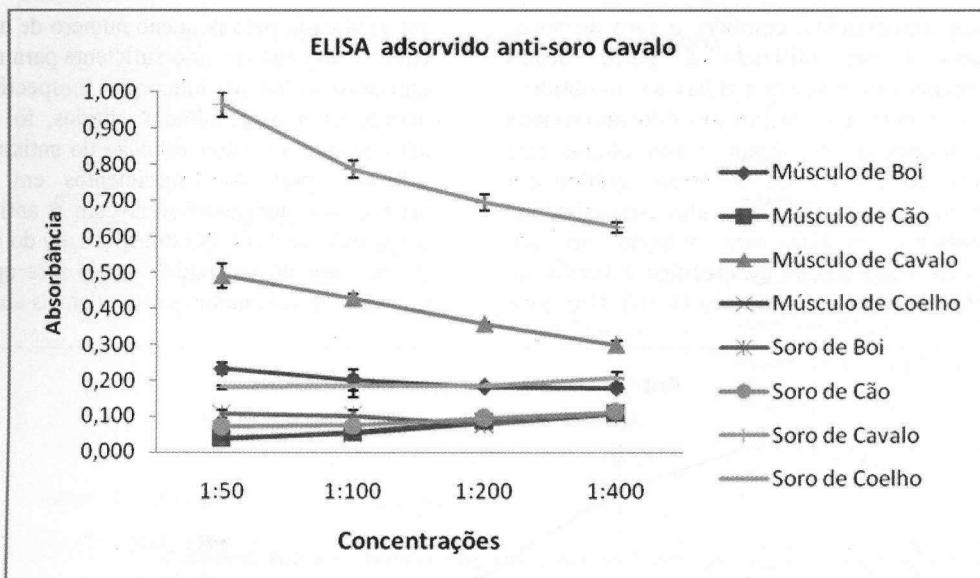


Gráfico 7: ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de cavalo; diluição seriada

No gráfico 8, está representado a reatividade do antissoro de coelho com seus homólogos e heterólogos. Da mesma forma que nos ensaios anteriores, seu homólogo apresentou absorbância superior em relação aos demais, enquanto que os抗ígenos heterólogos apresentaram um mesmo padrão baixo de reatividade. Além disso,

observa-se um grau de separação da curva homóloga, relacionada ao soro de coelho em relação aos demais抗ígenos heterólogos. Observa-se também neste resultado uma manutenção da reatividade específica na maior diluição de antissoro testado (1:400).

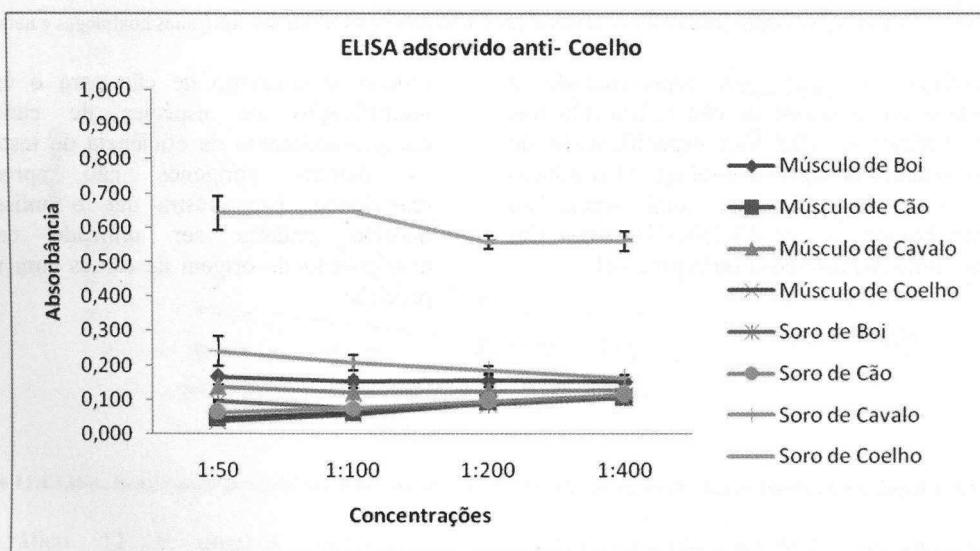


Gráfico 8:ELISA. Incubação com adsorvido antissoro de coelho; diluição seriada

4.3 - Especificidade dos antissoros em diluição seriada

Nesta etapa, os antissoros já adsorvidos três vezes em colunas de imunoafinidade foram testados com o objetivo de observar qual seria a

melhor diluição para os ensaios de quantificação dos抗ígenos. O抗ígeno músculo de coelho não foi utilizado nesta modalidade de ensaio, uma vez que foi observado que a carne de coelho seria uma das poucas carnes que poderiam ser consideradas para questões de fraudes em

produtos alimentícios, contudo, o soro de porco começou a ser utilizado a partir destes experimentos, uma vez que já havia sido obtido.

O antissoro de boi em diluição seriada contra抗ígenos homólogos e heterólogos está representado no gráfico 9. Neste gráfico foi novamente demonstrado uma alta especificidade do antissoro anti-boi em relação ao seu homólogo. Uma reação inespecífica é verificada na menor diluição do antissoro (1:10). Isto pode

ser explicado pelo pequeno número de adsorções (três vezes) não ter sido suficiente para retirar do antissoro todos os anticorpos inespecíficos. De acordo com os resultados obtidos, foi possível afirmar que a melhor diluição do antissoro a ser utilizado para os experimentos em diluição seriada dos抗ígenos seria com o antissoro na proporção de 1:40. Na diluição 1:80 do antissoro de boi, seu desvio padrão tende a se aproximar dos valores calculados para as demais amostras.

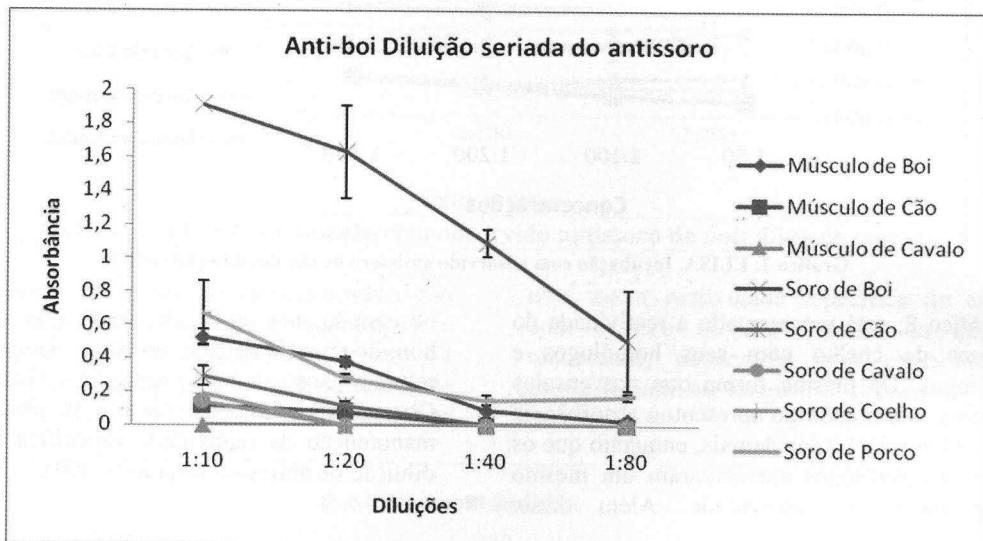


Gráfico 9: ELISA. Reatividade do antissoro Anti-boi adsorvido três vezes frente aos抗ígenos homólogos e heterólogos.

No gráfico 10, que está representando a reatividade do antissoro de cão (adsorvido três vezes), verifica-se uma alta especificidade do antissoro contra抗ígeno homólogo. O resultado mostra uma especificidade total frente ao抗ígeno homólogo nas diluições testadas. Em qualquer uma das diluições seria possível

utilizar o antissoro de cão para o ensaio de identificação de espécies de carne, sem comprometimento da eficiência do teste. Todos os demais抗ígenos não apresentaram reatividade. Isto mostra que o antissoro em questão poderia ser utilizado em uma averiguação de origem de carnes com uma alta precisão.

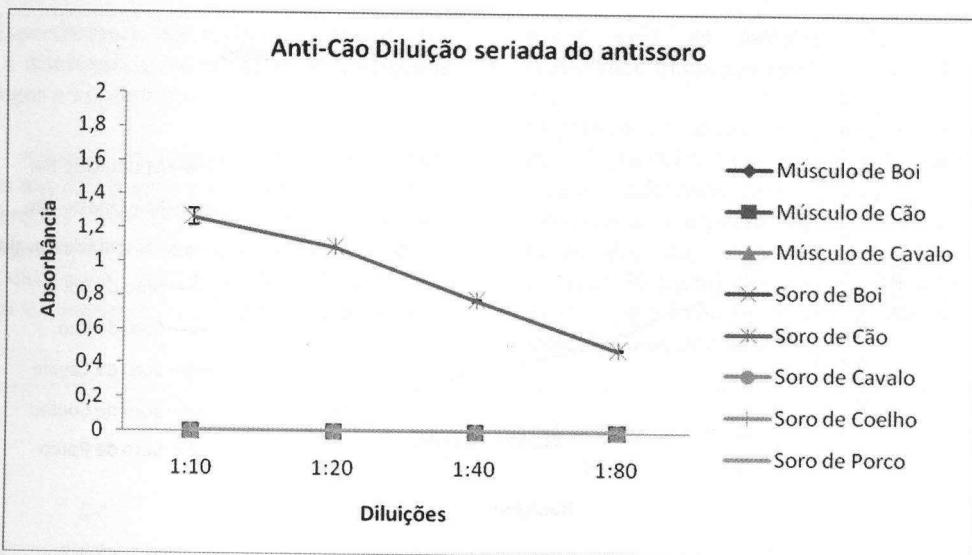


Gráfico 10:ELISA. Reatividade do antissoro Anti-cão adsorvido três vezes frente aos antígenos homólogos e heterólogos.

No gráfico 11, relacionado à efetividade do antissoro de cavalo adsorvido três vezes, o mesmo apresentou especificidade frente ao homólogo nas diferentes diluições utilizadas, à exceção da diluição 1:80. Apesar disso, percebe-se uma reatividade cruzada em menor

grau de intensidade com os heterólogos soro de cão e soro de porco. A explicação para este tipo de inespecificidade seria que, as três adsorções não foram suficientes para remover em sua totalidade os anticorpos inespecíficos.

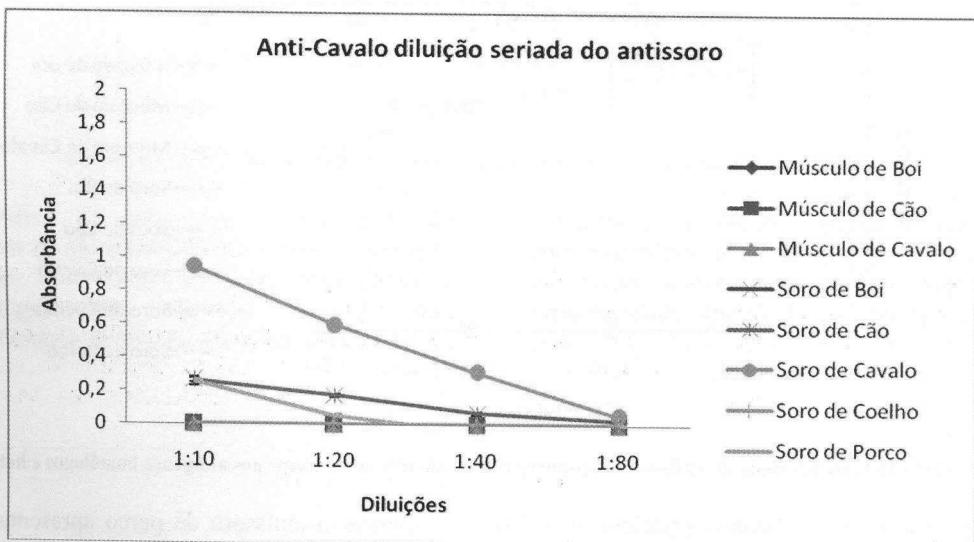


Gráfico 11:ELISA. Reatividade do antissoro Anti-cavalo adsorvido três vezes frente aos antígenos homólogos e heterólogos.

No gráfico 12 é possível observar a especificidade do antissoro de coelho (adsorvido três vezes), frente ao antígeno homólogo em todas as diluições testadas, ocorrendo uma alta reatividade do mesmo na diluição 1:10, atingindo

absorbância próximo de 1, enquanto os demais antígenos apresentaram reatividade nula com o antissoro. Neste caso, as três adsorções mostraram-se suficientes na remoção dos anticorpos inespecíficos.

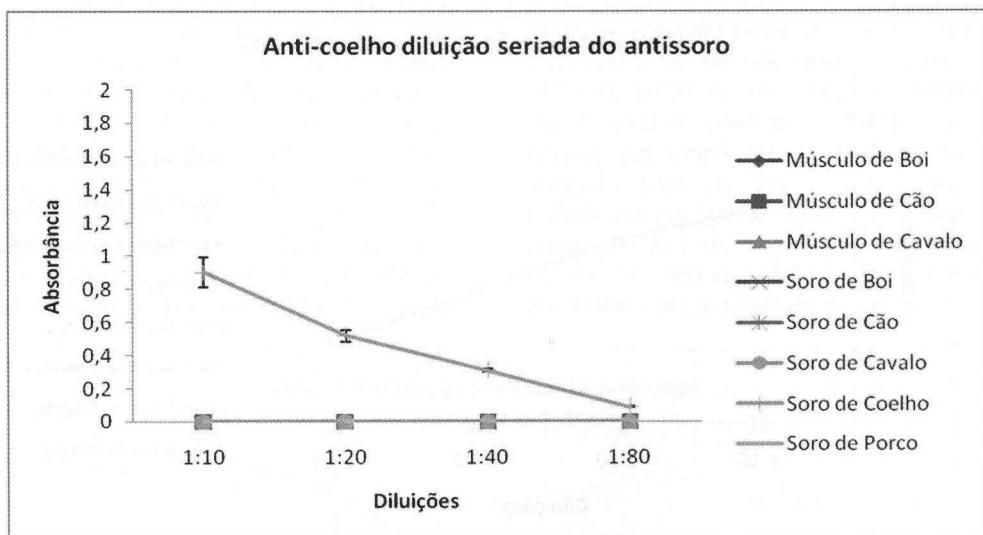


Gráfico 12: ELISA. Reatividade do antissoro Anti-coelho adsorvido três vezes frente aos抗ígenos homólogos e heterólogos.

O antissoro de porco adsorvido três vezes (gráfico 13), apresentou alta especificidade e sensibilidade frente ao antígeno homólogo, em

todas as diluições testadas. Novamente, para este antissoro as três adsorções foram suficientes para retirar os anticorpos inespecíficos.

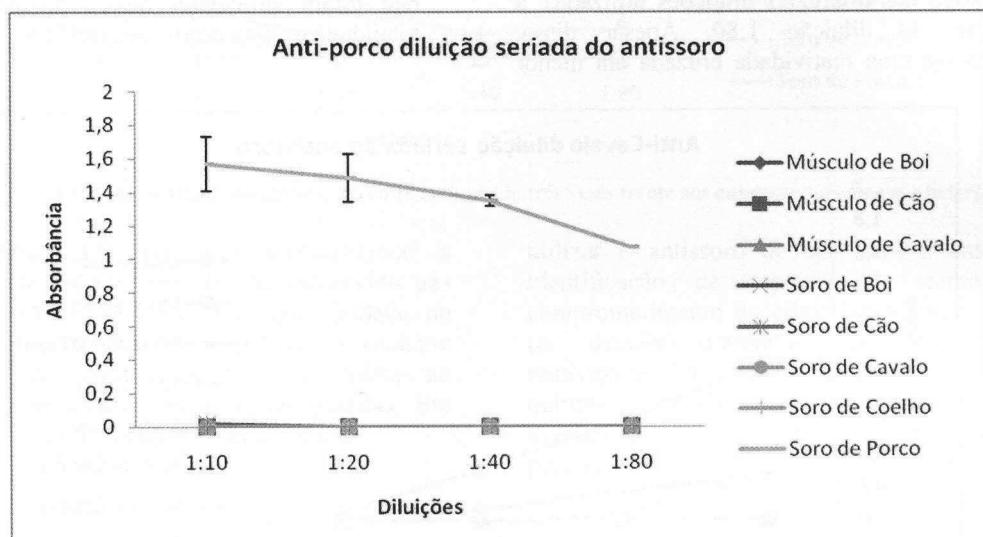


Gráfico 13:ELISA. Reatividade do antissoro Anti-porco adsorvido três vezes frente aos抗ígenos homólogos e heterólogos.

Os ensaios acima realizados (gráficos 9 a 13) tiveram como objetivo a determinação de diluições fixas dos diferentes antissoros adsorvidos para serem utilizados nos testes de identificação das espécies de carnes. Para o antissoro de boi, foi utilizada a diluição do antissoro na proporção 1:25; para o anti-cão, 1:50 (este valor foi definido visualizar que,

mesmo o antissoro de porco apresentando uma boa reatividade em relação ao seu homólogo em todas as diluições, foi um valor próximo de 1,0 em sua absorbância); no antissoro anti-cavallo foi utilizada a diluição de 1:25; para o anti-coelho, 1:100; e finalmente, para o anti-porco, a diluição 1:25.

4.4 - Especificidade dos antissoros adsorvidos frente a diferentes concentrações de抗igenos homólogos e heterólogos

Nestes ensaios, os soros adsorvidos foram testados nas diluições acima determinadas frente a diferentes concentrações dos抗igenos homólogos e heterólogos para confirmação da especificidade e sensibilidade obtidas. Os filtrados de músculos não foram utilizados nesta

etapa, pois os mesmos não apresentaram reatividade frente aos antissoros adsorvidos.

O gráfico 14, mostra a reatividade do antissoro de boi adsorvido três vezes na diluição fixa 1:25, frente a diferentes concentrações dos抗igenos. Observa-se a especificidade frente ao抗igeno homólogo, nas concentrações de抗igenos testados 10 μg/ml a 0,1 μg/ml. Na concentração de 0,01 μg/ml não foi observado a especificidade frente ao抗igeno homólogo.

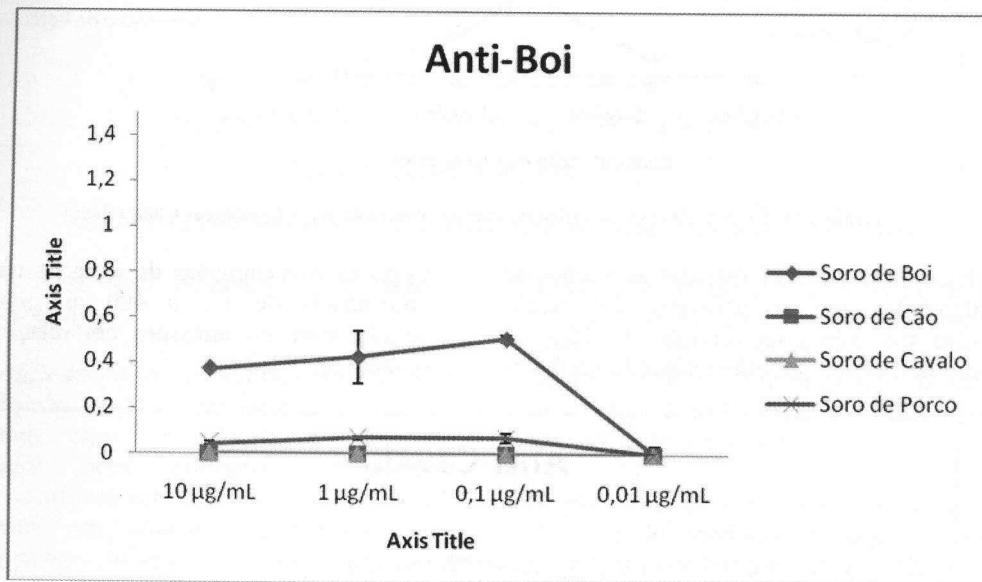


Gráfico 14: ELISA. Reatividade do antissoro anti-boi contra os soros homólogos e heterólogos.

No gráfico 15 observa-se a reatividade do antissoro de cão adsorvido três vezes, na diluição fixa de 1:50 contra抗igenos homólogos e heterólogos. O resultado mostra uma especificidade frente as concentrações de 10 a

0,1 μ/ml. O resultado é similar ao apresentado com o antissoro de boi no que diz respeito à faixa de sensibilidade. Ambos não apresentaram especificidade frente à concentração de 0,01 μ/ml.

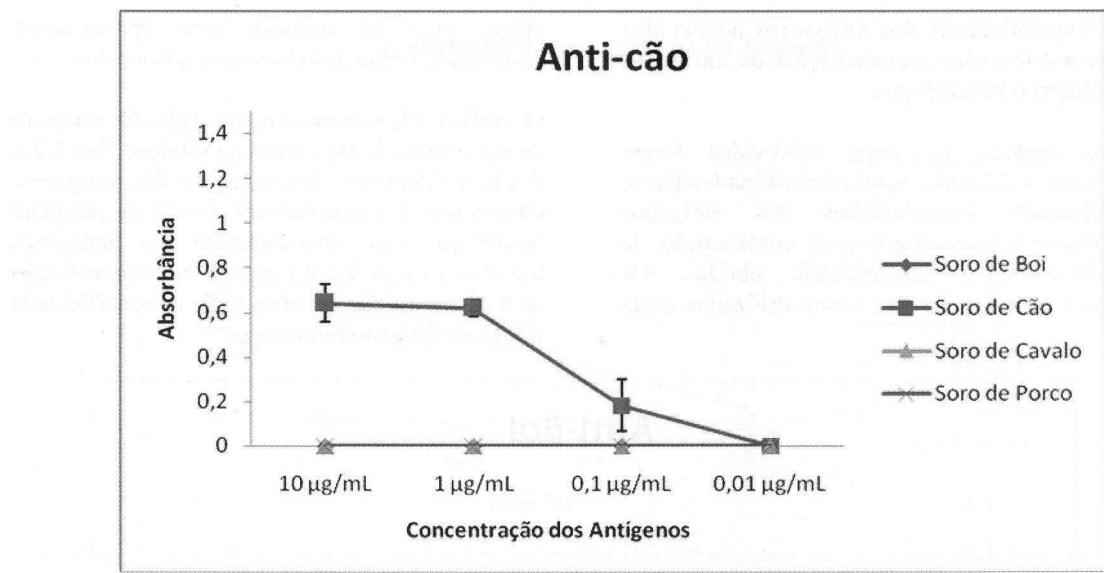


Gráfico 15: ELISA. Reação do antissoro anti-cão contra os soros homólogos e heterólogos.

No gráfico 16, estão demonstradas as reações de especificidade com o antissoro de cavalo adsorvido três vezes na diluição de 1:25. O antissoro de cavalo apresentou especificidade em

todas as concentrações de antígeno testadas. A absorbância de 1,2 a 490 nm mostra alta sensibilidade do antissoro em relação ao seu homólogo.

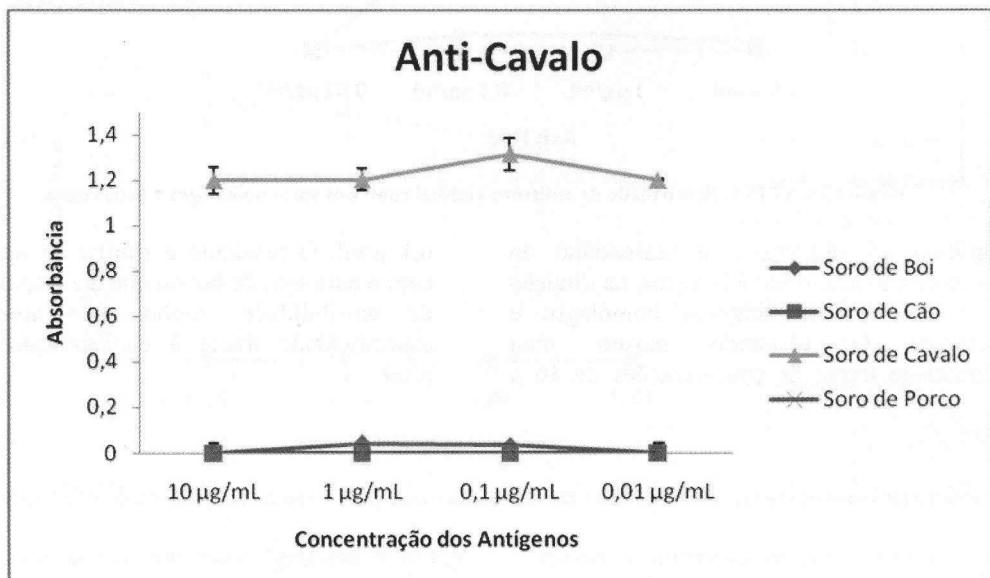


Gráfico 16: ELISA. Reação do antissoro anti-cavalo contra os soros homólogos e heterólogos.

No antissoro de porco adsorvido três vezes, diluição 1:25 (gráfico 17), houve um mesmo padrão de especificidade apresentados nos gráficos 14 e 15, com uma alta reatividade frente as diferentes concentrações do antígeno homólogo. A especificidade do antissoro é observada na faixa de concentração de antígeno de 10 a 0,1 µ/ml.

As diluições definidas anteriormente mostraram-se eficazes na identificação específica de抗ígenos de diferentes espécies de carnes. Os antissoros adsorvidos poderiam estar aptos a serem utilizados para testes de identificação em alimentos processados.

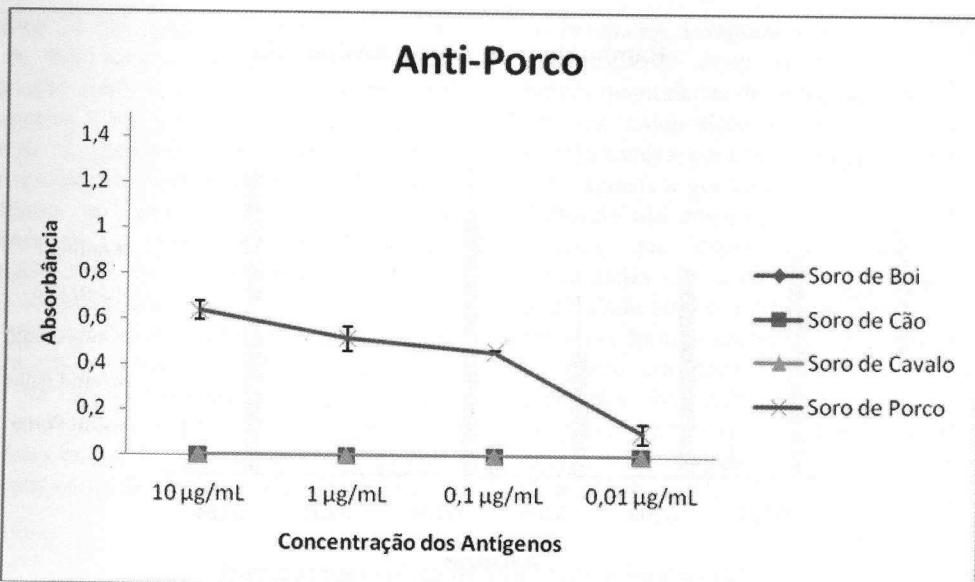


Gráfico 17: ELISA. Reação do antissoro anti-porco contra os soros homólogos e heterólogos.

4.5 - Testes em Alimentos Processados (Hambúrgueres)

Nesta etapa do estudo, os antissoros adsorvidos nas diluições fixadas previamente e que se mostraram específicos frente a抗原os homólogos foram utilizados em ensaios imunoenzimáticos para identificação de espécies de carnes em alimentos processados. Os hambúrgueres utilizados nesta etapa do experimento foram analisados crus, com o intuito de ainda preservarem as características morfológicas de suas proteínas.

O gráfico 18 representa os seis lotes de uma marca de hambúrguer que possui em sua constituição carne de bovinos e de aves, onde foi testada a reatividade específica de todos os antissoros. No grupo G1 foi confirmada a especificidade demonstrada nos ensaios anteriores. Apenas o antissoro específico para boi mostrou reatividade frente às proteínas do alimento processado. Os demais antissoros não apresentaram reatividade, exceto o antissoro de

porco, que apresentou uma baixa reatividade, embora acima do *cut-off*. Esta reatividade poderia ser considerada como uma inespecificidade dentro da “zona cinzenta”, que é uma região de reatividade inespecífica onde deve ser solicitado um re-teste.

O grupo G1 apresentou em quase todos os seus lotes um alto resultado em relação à reatividade do antissoro de boi com seu homólogo, contudo, na amostra G105 não há nenhuma reatividade. Este resultado poderia ser interpretado de diversas formas: primeiro, a ausência do抗原o de boi no alimento; segundo, a presença de uma quantidade do抗原o de boi abaixo do nível de detecção do teste e por último, a substituição do抗原o cárneo (protéico) por gorduras. Como foi abordada na revisão de literatura, uma série de fatores pode dificultar a inspeção de produtos, e o teor de gorduras não é uma exceção. A diferença de intensidade na reatividade do antissoro de boi poderia sugerir variação nas concentrações de proteínas de boi no alimento processado.

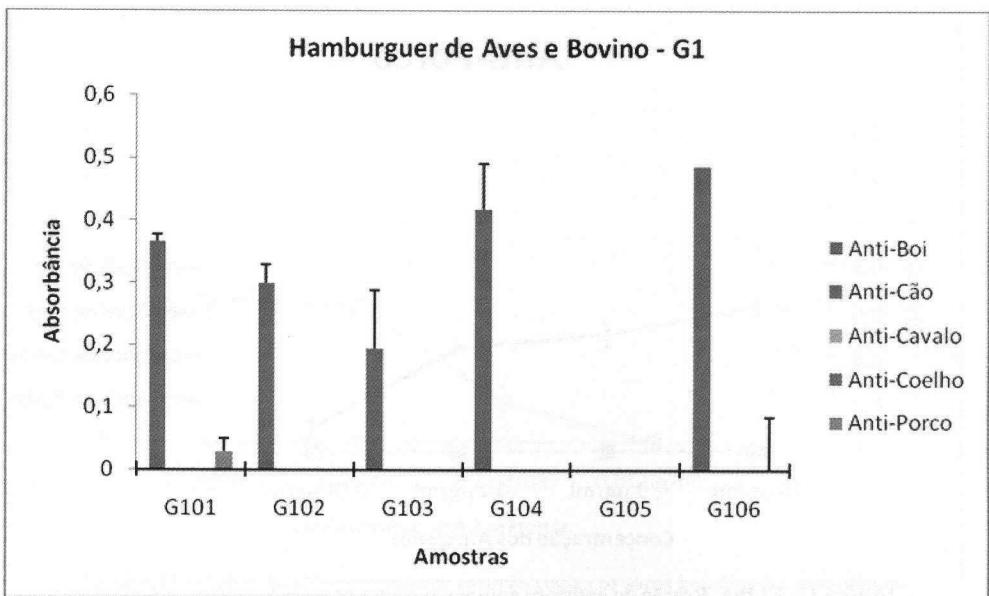


Gráfico 18: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueses). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de aves e bovina.

No gráfico 19 está representado o resultado para as amostras de hambúrgueres compostos por carnes de aves, bovina e suína (G2). Em todas as amostras foi detectado o conteúdo de carne de boi pelo antissoro específico. Observaram-se diferenças nos níveis de carne de boi detectadas nas diferentes

amostras. Apesar dos hambúrgueres aqui listados possuírem em sua composição gordura de porco listada no rótulo das embalagens, não observou-se reatividade pelo antissoro homólogo, indicando que a gordura animal adicionada ao hambúrguer não continha quantidade de proteínas dentro do limite de detecção do teste.

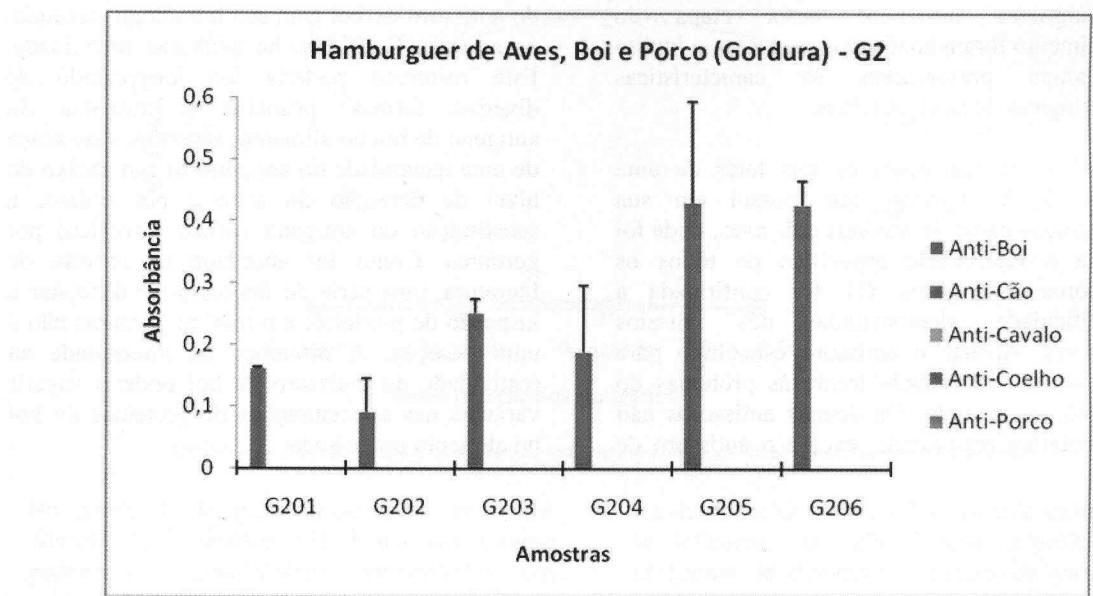


Gráfico 19: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueses). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de aves, bovina e gordura de suínos.

No gráfico 20 (G3, grupo de hambúrgueres de carne de boi, aves e porco), além da alta diferenciação entre os resultados das carnes de hambúrgueres, já observados nos ensaios anteriores, é possível notar também nos primeiros lotes uma reatividade inespecífica com o antissoro de cão, contudo, abaixo da absorbância de 0,1 pontos. O valor baixo foi considerado como margem de erro nos ensaios, ou uma inespecificidade ainda apresentada por alguns anticorpos com reatividade cruzada que poderiam estar presentes no antissoro de cão, que reagem de forma inespecífica com o seu respectivo homólogo. Além disso, apesar do rótulo desta marca de hambúrguer estar escrito que possuía carne de porco em sua composição,

os resultados levantaram a hipótese de que os hambúrgueres desta marca ou poderiam ter baixas quantidades de carne de porco adicionada em sua composição ou o material de suínos transformados para a obtenção do hambúrguer seria apenas a gordura de suínos. Para tanto, foi realizado um ensaio para tentar mostrar que, à medida que eram adicionados à amostra quantidades do soro de porco, ocorria uma reatividade com seu antissoro homólogo. Quatro amostras foram escolhidas e foi adicionado soro de porco em cada uma delas. A reatividade específica observada após a adição do antígeno de porco corrobora em parte a hipótese acima apresentada e confirma a reatividade específica do antissoro (gráfico 21).

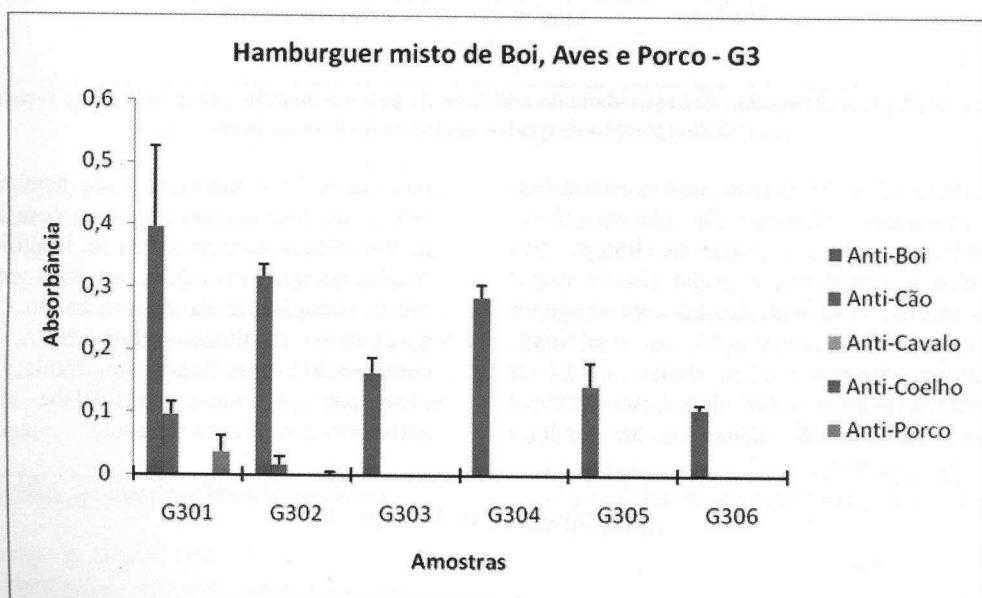


Gráfico 20: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carnes de aves, boi e porco.

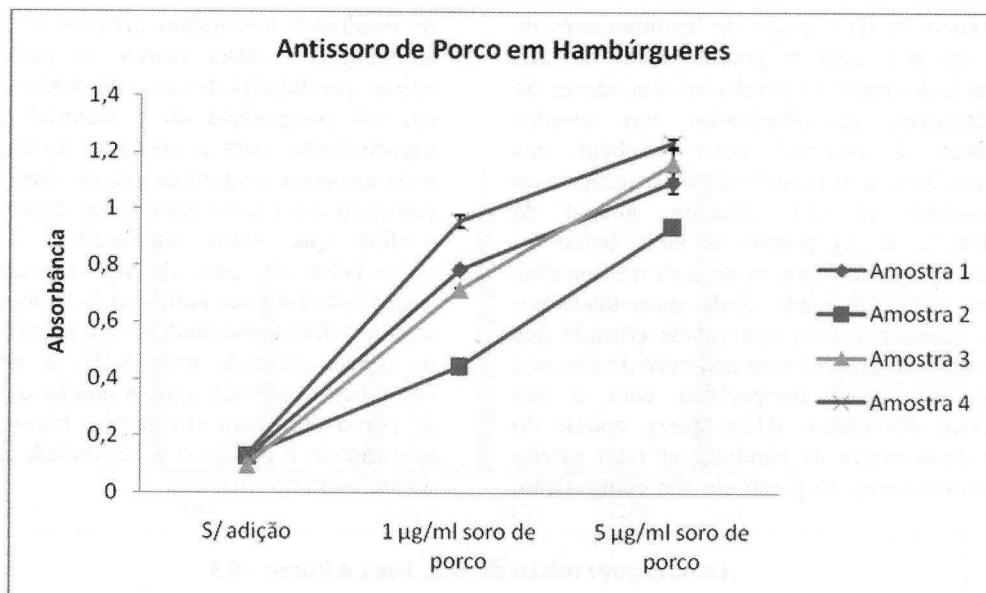


Gráfico 21: ELISA. Progresso da reatividade do antissoro de porco à medida que se adiciona o soro homólogo à composição de quatro amostras de hambúrguer.

Os gráficos 22 e 23 demonstram a reatividade dos antissoros diante de hambúrgueres fabricados apenas com carne de frango. Nos resultados apresentados, o grupo G4 foi o que teve amostras ainda identificadas com抗ígenos de boi em sua composição. A reatividade inespecífica observada ficou abaixo de 0,1 de absorbância, e poderia ser classificada também como “zona cinzenta”. Uma segunda hipótese

poderia ser a contaminação do hambúrguer de frango durante o processamento com抗ígenos de boi. Nos dois grupos, não foi identificado nos rótulos qualquer menção a carnes ou gorduras de outros animais que não fossem frango. O grupo 5 apresentou resultados concordantes com a composição especificada no rótulo. Não foi observada nenhuma reatividade com os antissoros heterólogos testados.

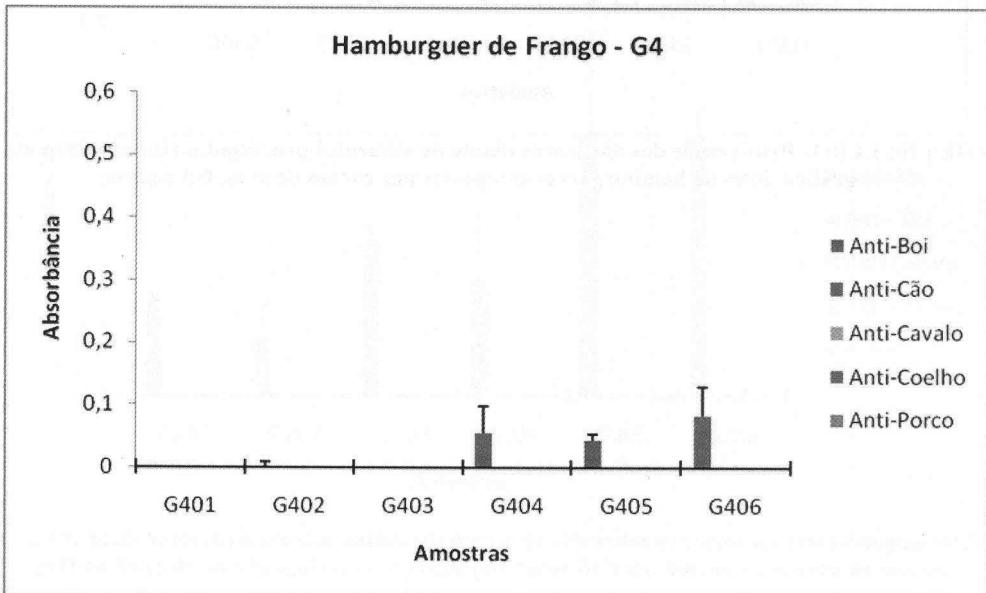


Gráfico 22: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de frango.

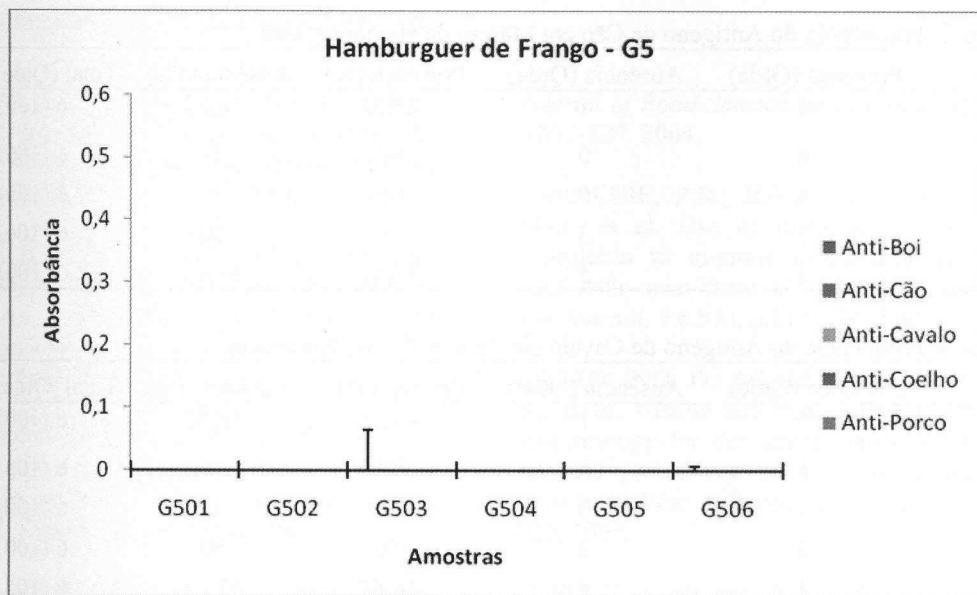


Gráfico 23: ELISA. Reatividade dos antissoros diante de alimentos processados (Hamburgueres). Neste gráfico, lotes de hambúrgueres compostos por carne de frango.

Apesar de uma pequena reatividade cruzada em alguns resultados, as leituras apresentaram-se satisfatórias, revelando um alto grau de especificidade e reatividade, mostrando que a metodologia empregada neste estudo mostra-se bastante eficaz e de grande auxílio para órgãos de vigilância sanitária no que diz respeito à procedência e qualidade de alimentos cárneos processados.

4.6 – Análise Estatística (Hambúrgueres)

As tabelas a seguir (tab. 1, 2, 3, 4 e 5) demonstram o que foi observado em relação à

freqüência de抗ígenos encontrados em cada um dos grupos de hambúrgueres amostrados. Todas as análises foram estatístico-descritivas. Nas tabelas de 1 a 5, é possível notar a presença ou ausência de algumas proteínas cárneas que não condizem com o especificado nos rótulos dos produtos, contudo, em comparação com os gráficos acima exibidos, é possível notar que apesar da incidência, as análises descritivas mostraram que há questões de baixa inespecificidade de alguns抗ígenos encontrados nas amostras.

Tabela 1: Frequência do Antígeno de Boi em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabela 2: Frequência do Antígeno de Cão em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabela 3: Frequência do Antígeno de Cavalo em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabela 4: Frequência do Antígeno de Coelho em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabela 5: Frequência do Antígeno de Porco em Marcas de Hambúrgueres

	Presença (Qtde)	Ausência (Qtde)	Presença (%)	Ausência (%)	Total (Qtde, %)
G1	5	1	83,33	16,67	6 (100)
G2	6	0	100	0	6 (100)
G3	6	0	100	0	6 (100)
G4	3	3	50	50	6 (100)
G5	1	5	16,67	83,33	6 (100)

Tabelas 1 a 5: Freqüência estatística dos diferentes抗ígenos em cada uma das cinco marcas de hambúrgueres testados.

5 – CONCLUSÃO

A metodologia imunológica (ELISA) testada é eficaz na obtenção de resultados para a avaliação e controle de origem de carnes em produtos cárneos, sendo um método sensível e específico: sensível no que diz respeito a detectar quantidades mesmas que pequenas de proteínas

cárneas em amostras; e específico no que diz respeito a identificar o antígeno em questão em uma amostra.

Com relação a amostras de carnes cozidas, contudo, a reatividade dos anticorpos produzidos ainda é baixa, uma vez que proteínas cárneas expostas ao calor podem-se desnaturar e comprometer a sua ligação com um anticorpo ou molécula que seria capaz de identificá-la.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASENSIO, L.; GONZALEZ, I.; GARCIA, T.; et al. Determination of Food Authenticity by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Food Control*, v.19, n.1, p.1-8, 2008.
- RELATÓRIO ANUAL 2009 (2010). *Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína*. 2010. 9p. Disponível em <http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>. Acesso em 20-05-2011.
- AVARAMEAS, S.; TERNYNCK, T. The cross-linking of protein with glutaraldehyde and its use for preparation of immunoabsorbents. *Immunochemistry*, v.6, p.43-52, 1969.
- AYOB, M.K.; SMITH, C.J. Immunoassay techniques for food analysis. *Sains Malaysiana*, nº19, p. 1-28, 1990.
- BELLORINI, S.; STRATHMANN, S.; BAETEN, V.; et al. Discriminating animal fats and their origins: assessing the potentials of Fourier transform infrared microscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction techniques. *Anal. Bioanalytical Chem.*, v.382, p.1073-1083, 2005.
- BERZAGHI, P; DALLE ZOTTE, A.; JANSSON, L.M.; et al. Near-infrared reflectance spectroscopy as a method to predict chemical composition of breast meat and discriminate between different n-3 feeding sources. *Poultry Science*, v.84, n.1, p.128-136, 2005.
- BILLETT, E. E.; BEVAN, R.; SCANLON, B.; et al. The use of a poultyspecific murine monoclonal antibody directed to the insoluble muscle protein desmin in meat speciation. *Journal Science Food Agric*, v.70, n.3, p.396-404, 1996.
- BONWICK, G. A.; CRESSWELL, J. E.; TYREMAN, A. L.; et al. Production of murine monoclonal antibodies against sulcofuron and flucofuron by in vitro immunization. *Journal of Immunological Methods*, v.196, p.163-176, 1996.
- BONWICK, G. A.; SMITH, C.J. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *Internacional Journal of Food Science and Technology*, v.39, p.817-827, 2004.
- CARNEGIE, P.R.; ILIC, M.Z.; ETHERIDGE, M.O.; et al. Use of histidine dipeptides and myoglobin to monitor adulteration of cooked beef with meat from other species. *Australian Vet Journal*, v.62(8), p.272-276, 1985.
- COZZOLINO, D.; MURRAY, I.; PATERSON, R.; et al. Visible and near infrared reflectance spectroscopy for the determination of moisture, fat and protein in chicken breast and thigh muscle. *J Near Infrared Spectrosc*, v.4, p.213-223, 1996.
- CTSCCV (*Code des Usages de la Charcuterie, de la Salaison et des Conserves de Viandes*). Maisons-Alfort, France: CTSCCV, 1997.
- DALL' ALBA, C.; HAUSSEN, D. C.; MARX, C. B.; et al. Relato de caso Creutzfeldt-Jakob: primeiro relato de caso no Rio Grande do Sul, *Revista da AMRIGS*, vol 48, ano 2, n. 73 , p. 99 – 102, 2004.
- DA-RIZ, V.; DEMEULEMESTER, C. Technologies des produits de charcuterie et des salaisons: Contrôle des produits au stade de la commercialisation. Londres: Tec & Doc, p. 449-509, 1999.
- Departamento de Saúde do Reino Unido. *Monthly CJD statistical figures*. UK Department of Health [WWW document]. Disponível em <http://www.dh.gov.uk/PolicyAndGuidance/HealthAndSocialCareTopics/CJD/CJDGeneralInformation/fs/en>. 2004. Acesso em 13 de Abril de 2008.
- DING, H. B.; XU, R. J.; CHAN, D. K. O. Identification of broiler chicken meat using a visible/near-infrared spectroscopic technique. *J Sci Food Agric*, v.79, p.1382-1388, 1999.
- DOWNEY, G.; MCELHINNEY, J.; FEARN, T. Species identification in selected raw homogenized meats by reflectance spectroscopy in the mid-infrared, near infrared and visible ranges. *Applied Spectroscopy*, v.54, p.894-899, 2000.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA EM AGROPECUÁRIA. *A carne como alimento*. Disponível em <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/02carnealimento.html>. Acesso em 15 de abril de 2011.

FUMIÉRE, O.; VEYS, P.; BOIX, A.; et al. Methods of Detection, Species Identification and Quantification of Processed Animal Proteins in Feedstuffs. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, v.13(S), p.59-70, 2009.

GARCIA, T.; MARTIN, R.; MORALES, P.; et al. Production of a horse-specific monoclonal antibody and detection of horse meat in raw meat mixtures by an indirect Elisa. *Journal Science Food Agric.*, v.66(3) p.411-415, 1994.

GIOVANNACCI, I.; GUIZARD, C.; CARLIER, M.; et al. Species Identification of Meat Products by ELISA. *International Journal of Food Science and Technology*, nº 39, p. 863-867, 2004.

GIZZI, G.; VON HOLST, C.; BAETEN, V.; et al. Intercomparison study for the determination of processed animal proteins including meat and bone meal in animal feed. *Relatório final de contrato administrativo nº B5-1000/02/000483. JCR-IRMM*, 2003. 100p.

GOSLING, J. P. *Immunoassays: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford. 2000. 304 p.

HSIEH, Y. H., SHEU, S. C., & BRIDGMAN, R. C. Development of a monoclonal antibody specific to cooked mammalian meat mixtures. *Meat Science*, v.15, p.1-13, 1998.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; HUNT, S.; et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6^a ed. Londres, Churchill Livingstone, 2004. 848p.

KESMEN, Z.; SAHIN, F.; YETIM, H. PCR assay for the identification of animal species in cooked sausages. *Meat Science*, v.77, n.4, p. 649-653, 2007.

KIM, S. H.; HUANG, T. S.; SEYMOUR, A.; et al. Development of Immunoassay for Detection

of Meat and Bone Meal in Animal Feed. *Journal of Food Protection*, v. 68, nº 9, p. 1860-1865. 2005.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature*, nº256, p. 495-497. 1975.

KORPIMAKI, T.; ROSENBERG, J.; VIRTANEN, P.; et al. Further improvement of broad specificity hapten recognition with protein engineering. *Protein Engineering*, nº16, p. 37-46, 2003.

KREBS, B.; RAUCHENBERGER, R.; SILKE, R. High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *Journal of Immunological Methods*, v.254, p. 67-84, 2001.

LIDDEL, E.; WEEKS, I. *Antibody Technology*. Oxford. Taylor & Francis Ltd., 1995. 160p.

LUCHIARI FILHO, A. Produção de Carne Bovina no Brasil: Qualidade, Quantidade ou Ambas?. *Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte*. 10p. Brasil, 2006.

MARTIN, R.; AZCONA, J.I.; TORMO, J.; et al. Detection of chicken meat in raw meat mixtures by a sandwich enzyme assay. *International Journal of Food Science and Technology*, v.23, p.303-310, 1988.

MCCAFFERTY, J.; GRIFFITHS, A. D.; WINTER, G. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, v.348, p.552-554, 1990.

MCELHINNEY, J.; DOWNEY, G.; O'DONNELL, C. Quantitation of Lamb Content in Mixtures with Raw Minced Beef Using Visible, Near and Mid-Infrared Spectroscopy. *Journal of Food Science*, v.64, p.587-591, 1999.

MÉRET, V.; DA-RIZ, V.; GUIZARD, C.; et al. Méthodes d'indentification de l'origine des protéines animales et végétales dans les produits carnés. *Annales des Falsifications de l'Expertise Clinique & Toxicologique*, nº 92, p. 495-511, 1999.

MORALES, P.; GARCÍA, T.; GONZÁLEZ I.; et al. Monoclonal antibody detection of porcine meat. *Journal of Food Protection*, v.57(2), p.146-149, 1994.

MYERS, M. J.; YANCY, H. F.; FARRELL, D. E.; et al. Evaluation of two commercial lateral-flow test kits for detection of animal proteins in animal food. *Journal of Food Protection*, v.68(12), p.2656-2664, 2005.

NITRINI, R. Nova variante da doença de Creutzfeld-Jakob: A doença priônica humana relacionada à encefalopatia espongiforme bovina – “Doença da Vaca Louca”. *Rev. Associação de Medicina Brasileira*, Vol.47 no.2 , p. 25 - 28, 2001.

PATTERSON, R. L. S.; JONES, S. J. Review of Current Techniques for the Verification of the Species Origin of Meat. *Analyst*, n.115, p.501-506, 1990.

PIER, G. B.; LYCZAK, J. B.; WETZLER, L.M. *Immunology, Infection and Immunity*. ASM Press, Washington. 718p, 2004.

PRADO, M.; BERBEN, G.; FUMIÈRE, O.; et al. Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real time polymerase chain reaction: result of an interlaboratory study. *J. Agric. Food Chem.*, v.55, p.7495-7501, 2007.

RANNOU, H.; DOWNEY, G. Discrimination of raw pork, chicken and turkey meat by spectroscopy in the visible, near- and mid-infrared ranges. *Anal Commun* v.34, p.401-404, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Regulamento da Inspeção Industrial e sanitária de Produtos de Origem Animal*. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, 1997.

SAEED, T.; SAWAYA, W. N.; MAMEESH, M.; et al. Detection of pork in processed meat: Experimental comparison of methodology. *Food Chemistry*, v. 37, nº 3, p. 201-219, 1988.

SWART, K. S.; WILKS, C. R. An Immunodiffusion Method for the Identification of the Species of Origin of Meat Samples. *Australian Veterinary Journal*, v.59. p.21-22, 1982.

THYHOLT, K.; ISAKSSON, T. Differentiation of frozen and unfrozen beef using nearinfrared spectroscopy. *J Sci Food Agric* v.73, p.525-532, 1997.

TIJSSEN, P. *The Nature of immunogens, antigens and haptens*. In: BURDEN, R. H.; VAN KNIPPENBERG, P. H. (Ed.) *Practice and Theory of Enzyme Immunoassay*. 1. ed. Amsterdam, 1985. p. 39-41.

TINBERGEN, B. J.; SLUMP, P. The detection of chicken meat in meat products by means of the anserine/carnosine ratio. *Z. Lebensm Unters Forsch*, v.161, p.7-11, 1976.

RELATÓRIO ANUAL UBA 2009. *União Brasileira de Avicultura*. 40p, 2010. Disponível em http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php. Acesso em 20-05-2011.

VAN RAAMSDONK, L. W. D.; HEKMAN, W.; VLIEGE, J. M.; et al., The 2008 Dutch NRL/IAG proficiency test for detection of animal proteins in feed. <http://library.wur.nl/way/bestanden/clc/1876397.pdf> (acesso em 20.11.08), 2008.

VEYS, P.; BAETEN, V. CRL-AP Interlaboratory study 2006 final report. http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/resources/interlaboratory2006_en.pdf, (acesso em 18.11.08), 2007.

WITTAKER, R. G.; SPENCER, T. L.; COPLAND, J. W. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Species Identification of Raw Meat. *Journal of Science Food Agriculture*, nº34, p. 1143-1148, 1983.

ZAPPA, V.; PUZZI, M. B.; XAVIER, A.; et al. Encefalopatia Espongiforme Bovina. *Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária*, Ano VI, nº 10, 2008.

Melina Matias Ribeiro De Oliveira Moraes

**PRODUÇÃO DE ANTISSORO ESPECÍFICO PARA A DETECÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO DE CARNE DE FRANGO EM ALIMENTOS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Cançado.

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFMG

Moraes, Melina Matias Ribeiro De Oliveira

Produção de antissoro específico para detecção e identificação
de carne de frango em alimentos [manuscrito] / Melina Matias
Ribeiro De Oliveira Moraes. - 2014.

48 p. : il.

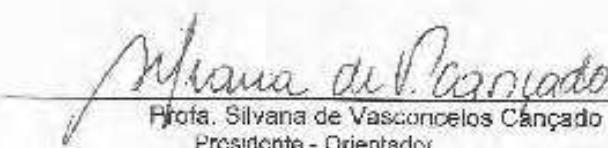
Orientadora: Silvana De Vasconcelos Cançado.

Coorientador: Luiz Guilherme Dias Heneine.

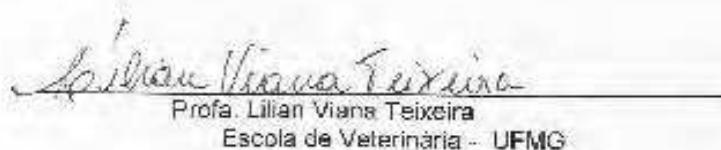
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária.

1.ELISA . 2.Carne de frango. 3.Imunoensaios. 4.anticorpos
policlonais. I.Cançado, Silvana De Vasconcelos. II.Heneine, Luiz
Guilherme Dias . III.Universidade Federal de Minas Gerais. Escola
de Veterinária. IV.Título.

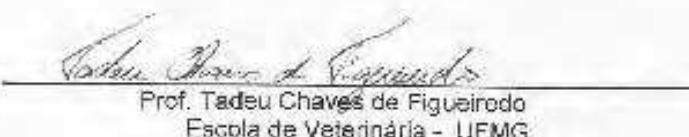
Dissertação defendida e aprovada em 25 de abril de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Silvana de Vasconcelos Cânçado
Presidente - Orientador


Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine
FUNED


Prof. Lilian Viana Teixeira
Escola de Veterinária - UFMG


Dra. Liane Denize Miranda Meneses
IMA


Prof. Tadeu Chaves de Figueirodo
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Ao meu pai Ermelindo, pelo apoio, exemplo, dedicação, oportunidade, compreensão e todos os puxões de orelha.

Meus irmãos Flávia e Pablo pelo amor, conselhos e companheirismo de toda uma vida.

Ao meu filho Caio, o maior amor do mundo e a razão de tudo isso.

Ao meu primeiro orientador prof. Carlos Chavéz pela orientação nos primeiros passos no mundo da Imunologia.

Ao meu chefito Ricardo Andrez, pela paciência durante longos anos.

À querida Lili e a todos do IMA pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos.

À Debora e a Anna pelo companheirismo e aventuras nas idas à fazenda, discussões científicas e risadas.

À minha orientadora, Prof. Dra. Silvana de Vasconcelos Cançado pela paciência, orientação e auxílio.

Ao meu co-orientador, Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine pelos ensinamentos, direcionamento e oportunidade na realização desse projeto.

À todos os amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada da Funed.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	13
Legislação.....	13
Métodos de identificação de espécies de carnes em alimentos.....	14
Microscopia clássica	15
Eletroforese	15
Métodos Físico-químicos	16
Espectroscopia no infravermelho.....	16
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	16
Métodos moleculares/genéticos	17
Métodos Imunológicos.....	18
- Anticorpos	18
- Antígenos	19
Imunodifusão em gel de Agarose (IDGA)	20
Contra imunoelétroforese	20
ELISA	21
Aplicações da metodologia de ELISA para identificação de espécies de carnes em alimentos ..	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
Obtenção de amostras	27
Tratamento das amostras.....	27
Imunização	27
Confecção das colunas de imunoafinidade.....	28
Obtenção de antissoros específicos.....	29

Teste de especificidade de anticorpos anti-frango de corte	30
Preparo das amostras experimentalmente contaminadas	31
Amostras experimentalmente contaminadas cruas	31
Amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente.....	32
ELISA indireto para amostras experimentalmente contaminadas	33
Testes em alimentos processados (Hambúrgueres)	34
Delineamento experimental.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
Título de anticorpos	34
Adsorção dos anticorpos em coluna heteróloga de imunoafinidade	35
Amostras experimentalmente contaminadas cruas	36
Amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente.....	37
Testes em amostras de hambúrgueres	40
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO I	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura geral de um anticorpo.....	19
Figura 2: Arranjo ELISA direto.....	21
Figura 3: Arranjo ELISA indireto.....	22
Figura 4: Arranjo ELISA sanduíche.....	22
Figura 5:Retirada do sangue total diretamente da veia jugular dos carneiros.....	29
Figura 6: Imunização com proteínas do músculo e soro de frango de corte.....	30
Figura 7: Pesagem das amostras experimentalmente contaminadas em diferentes proporções de carne de frango em carne bovina ou suína.....	32
Figura 8: Separação das proteínas solúveis em amostras experimentalmente fraudadas de carne crua.....	33
Figura 9: Título de anticorpos do soro coletado antes do início das imunizações (soro pré-imune) e após o ciclo de imunizações submetido a diluições sucessivas.....	35
Figura 10: Reatividade do soro antimúsculo adsorvido em coluna de imunoafinidade heteróloga frente extrato de músculo de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suínos.....	36
Figura 11: Reatividade do soro antissoro adsorvido em coluna de imunoafinidade heteróloga frente soro de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suínos.....	37
Figura 12: Relação entre a porcentagem de carne de frango de corte em carne bovina e a absorbância.....	38
Figura 13: Relação entre a porcentagem de carne de frango de corte em carne suína e a absorbância.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de carne de frango em amostras experimentalmente contaminadas e absorbâncias observadas em ELISA indireto.....	40
Tabela 2: Absorbâncias das amostras de hambúrgueres. Compostas por: grupo um: carne bovina, gordura suína e carne de aves; grupo 2: carne de aves.....	41

RESUMO

Um ensaio de ELISA indireto, específico para detectar e identificar carne de frango de corte em amostras de alimentos, foi desenvolvido utilizando anticorpos policlonais produzidos em carneiros, e purificados em colunas de imunoafinidade. Foram utilizadas amostras de carne bovina e suína, cruas e processadas termicamente, que foram adicionadas de carne de frango nas proporções de cinco, 10, 35 e 50%. Para a avaliação da detecção de carne de frango em hambúrgueres foram utilizados dois tratamentos (duas marcas de hambúrgueres) com seis repetições cada. O método não revelou reatividade cruzada com proteínas musculares de bovinos, coelhos, equinos e suínos. Foi observado ajuste dos dados ao modelo de regressão linear apresentando coeficiente de determinação acima de 0,99 sendo efetivo para quantificação de carne de frango em carne bovina ou suína em porcentagens de 5 a 50% de contaminação, em amostras cruas. Em amostras termicamente tratadas foi possível classificá-las, de modo qualitativo, quanto a presença ou ausência de carne de frango. Ao testar amostras de hambúrgueres comerciais foi possível detectar proteínas cárneas de frango de corte, ainda que na presença de proteínas cárneas de outras espécies animais. Foi concluído que o método imunológico utilizado, ELISA indireto, mostrou seletividade na detecção de proteínas de carne de frango de corte em amostras cruas ou termicamente tratadas.

Palavras chave: carne de frango, ELISA indireto, ensaios imunoenzimáticos, anticorpos policlonais.

ABSTRACT

An indirect ELISA specific for detecting and identifying broiler meat in food samples was developed using polyclonal antibodies produced in sheep, and purified on immunoaffinity columns. Beef and pork samples were used raw and heat-processed, and have been added to the chicken meat ratios of five, 10, 35 and 50%. For the evaluation of chicken detection on burgers were used two treatments (two brands of burgers) with six replicates each. The method revealed no cross-reactivity with bovine muscle proteins, rabbits, horses and pigs. It was observed data adjustment to the linear regression model showing determination coefficient above 0.99 and was effective quantification of chicken meat in beef or pork in percentages 5-50% contamination in raw samples. In heat-processed samples was possible to classify them, qualitatively, as the presence or absence of chicken. When testing samples of commercial burgers could be detected broiler meat proteins, even in the presence of meat proteins of the other species. It was concluded that the immune method, ELISA showed selectivity in the detection of broiler meat proteins in raw or heat-treated samples.

Key words: chicken, ELISA, immunoassays, polyclonal antibodies.

INTRODUÇÃO

A avicultura do Brasil tem ganhado cada vez mais espaço no cenário mundial, e o país tem se destacado entre os grandes produtores e exportadores do ramo nos últimos anos. De acordo com os dados da União Brasileira de Avicultura foram produzidas 12,3 milhões de toneladas de carne de frango no ano de 2013. Deste volume total de carne produzido pelo país, 8,4 milhões de toneladas (68,4%) foi destinado ao consumo interno e 3,9 milhões (31,6%) para as exportações, mantendo o Brasil como maior exportador do mundo de carne de frango (ABPA, 2014).

Segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) o agronegócio brasileiro representa boa parte do produto interno bruto (PIB) do país, contribuindo no ano de 2013 com 22,8% deste. A avicultura industrial contribuiu com, aproximadamente, 1,5% desse índice, o que demonstra a importância da atividade para a economia brasileira (CNA, 2014; ABPA, 2014).

Dentre os animais de produção terrestres, a carne suína é a fonte de proteína animal mais consumida mundialmente, porém, a carne de frango tem demonstrado grande potencial para atingir o topo do consumo dentro de alguns anos. O consumo per capita mundial de carne de frango tem apresentado rápido crescimento e, segundo estimativas, deverá ultrapassar o consumo de carne suína antes de 2020. No Brasil, a carne de frango já é a fonte de proteína mais consumida, seguida pela carne bovina e em terceiro lugar pela carne suína. O consumo de frango no país passou dos 11,8 kg per capita em 1988 para 41,8 kg em 2013, representando um aumento de 360% nos últimos 25 anos (FAO, 2013; ABPA, 2014).

A expressividade internacional do Brasil como exportador de alimentos de origem animal, assim como as crescentes exigências do próprio mercado interno, faz com que a cadeia produtiva se preocupe com a produção de alimentos seguros e de qualidade. A carne de frango é uma excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e de minerais, sendo considerado um alimento de alto teor nutricional. Desta maneira, para garantir o crescimento do setor avícola, é preciso aliar um preço competitivo a produtos de alta qualidade, pois o consumidor, cada vez mais exigente, não utiliza apenas o preço e as propriedades nutricionais dos alimentos como critério de decisão no momento em que vai adquirir o produto (Cawthorn et al., 2013).

Nos últimos anos tem havido um aumento da variedade de produtos cárneos disponíveis no mercado, atendendo a um número cada vez maior de consumidores que procuram alimentos industrializados pela sua praticidade. O processo de industrialização causa intensa modificação

nas características naturais das carnes dificultando sua identificação por inspeção visual e sensorial. Devido a esse crescimento em produção e qualidade e ao menor custo, a carne de frango tem sido comumente utilizada na formulação e também na adulteração de diversos produtos processados (Hsieh et al., 1995; Djurdjevic et al., 2005).

O uso de carne de espécie não declarada, e/ou de proteína não cárnea em quantidade diferente da descrita no rótulo de produtos processados tem sido observado por diversos pesquisadores em vários países seja devido à contaminação ou a fraude propriamente dita. Essa conduta envolve questões de ordem econômica (pelo uso de carne de menor valor), religiosa (algumas religiões não permitem o consumo de carne de certas espécies), e de saúde pública (pela veiculação de micro-organismos que não deveriam estar presentes naquele tipo de produto, e abate de animais que foram tratados com medicamentos não permitidos àqueles que são destinados ao consumo humano) (Flores-Munguia et al., 2000; Cawthorn et al., 2013).

O poder de escolha do consumidor deve ser preservado, tornando-se ainda mais importante a garantia de autenticidade dos alimentos, e a correta rotulagem dos mesmos. Este direito é assegurado pelo Código de Defesa do Consumidor que estabelece como impróprios ao consumo alimentos adulterados, falsificados ou fraudados. Os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ) de alimentos estabelecem a composição e os padrões que alguns produtos cárneos devem possuir, e a não observância desses padrões e a consequente perda da autenticidade dos produtos é caracterizado como fraude (BRASIL, 1990).

Em 2013 foi divulgada na Europa a fraude de hambúrgueres e lasanhas pela substituição de carne bovina por equina, que em muitos produtos chegava a 100%. Além da violação legal, em razão da rotulagem incorreta, há o risco sanitário, uma vez que a carne utilizada para a fabricação dos produtos pode ser proveniente de animais não destinados ao consumo humano (Hsieh et al., 2014)

O conceito de segurança alimentar está relacionado à inocuidade e também à quantidade e a qualidade do alimento disponível. Visando garantir a segurança dos alimentos, vários parâmetros são exigidos pela legislação vigente. Porém, para verificar, a conformidade ou não dos produtos de acordo com esses parâmetros, são necessários métodos analíticos confiáveis e precisos. Várias metodologias podem ser usadas para diferenciação das espécies de carne em produtos crus ou submetidos a algum processamento térmico. Os métodos mais utilizados atualmente são as técnicas moleculares/genéticas e os ensaios imunológicos.

Ensaios imunoenzimáticos são testes utilizados para detectar e quantificar moléculas antigênicas específicas. Desta maneira, todos os imunoensaios são baseados em medições da ligação de um antígeno com seu anticorpo correspondente, e suas variações promovem menor ou maior sensibilidade de acordo com o arranjo utilizado. O método de ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay) tornou-se o principal imunoensaio entre muitos utilizados atualmente. Essencialmente, este método depende da imobilização de抗ígenos ou anticorpos em uma superfície sólida. As maiores vantagens do ELISA sobre os métodos instrumentais tradicionais são sua sensibilidade e especificidade, preparação simples das amostras, alto rendimento e baixo custo por amostra (Bonwick e Smith, 2004).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia para produzir anticorpos capazes de detectar e identificar, através de ensaios imunológicos, a presença de carne de frango de corte em alimentos.

REVISÃO DE LITERATURA

Legislação

Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) entende-se por carne de açaougue as massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária. As carnes de bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, equídeos, suínos e coelhos são consideradas carne vermelha; e as carnes de aves (galináceos, perus) e peixes são classificadas como carne branca (BRASIL, 1997).

De acordo com o RIISPOA para a aprovação e registro do rótulo de um produto a indústria deve enviar ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o memorial descritivo de fabricação do produto detalhando sua composição e respectivas porcentagens. Ainda de acordo com este regulamento pode ser considerado impróprio ao consumo o produto de origem animal adulterado, fraudado ou falsificado. São considerados fraudados os produtos que tenham sido adicionados de substâncias de qualidade, espécie ou tipo diferentes das de sua composição natural sem prévia autorização do MAPA (BRASIL, 1997).

O Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal, publicado através da Instrução Normativa nº22 do MAPA, reafirma, de maneira clara, como informação obrigatória a

lista de ingredientes e sua composição no rótulo do produto. Assim, qualquer supressão na rotulagem, de ingredientes que fazem parte da composição do produto pode ser caracterizado como fraude ou adulteração (BRASIL, 2005).

O código de defesa do consumidor (Lei nº 8078 de 11 de setembro de 1990) dispõe sobre a proteção e defesa do consumidor certificando o direito do mesmo à informação. Segundo o artigo sexto desta Lei, a informação sobre os diferentes produtos deve ser adequada e clara, com especificação correta de quantidade, características, composição, qualidade, tributos incidentes e preço, bem como sobre os riscos que apresentem. Ainda, segundo este mesmo artigo a materialização do direito à informação ocorre através da rotulagem correta, clara e completa dos produtos uma vez que os rótulos são o meio de comunicação entre indústria e o consumidor (BRASIL, 1990).

As sanções e penalidades a quem rotula de maneira inadequada ou fraudosa, falsifica e adultera estes produtos estão previstas em Lei. Segundo a Lei nº 6437, de 20 de agosto de 1977, é passível de advertência, apreensão e inutilização do produto, suspensão de venda ou fabricação, cancelamento do registro e interdição parcial ou total do estabelecimento ou multa a quem fraudar, falsificar ou adulterar alimentos e quaisquer outros produtos que interessem à saúde pública (BRASIL, 1977).

O Código Penal Brasileiro aborda diretamente a preservação da segurança alimentar e, a hipótese de fraude alimentar está prevista no capítulo III do art. 272. De acordo com este artigo, o fabricante ou comerciante que corromper, adulterar, falsificar ou alterar algum produto alimentício destinado ao consumo, tornando-o nocivo à saúde ou reduzindo-lhe o valor nutritivo está sujeito a pena de reclusão, de quatro a oito anos, e multa (BRASIL, 1998).

Métodos de identificação de espécies de carnes em alimentos

Microscopia clássica

A Microscopia óptica clássica, descrita pela diretiva da Comissão Europeia (2003/126/EC), é a metodologia oficial utilizada pela União Europeia (EU) para a detecção de proteínas animais processadas (PAP's) em alimentos destinados a ruminantes. O banimento do uso de PAP's na alimentação de ruminantes tem como finalidade conter a transmissão de encefalopatia espongiforme bovina (BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy). Porém, as técnicas de microscopia possuem limitações importantes, pois dependem da experiência do observador, e da presença de algumas partículas, como fibras musculares, ossos, pêlos ou penas para permitir a identificação. Outra limitação inerente ao método de microscopia é a não identificação espécie-específica, o que torna o método falho para classificar a proteína animal segundo sua espécie (Gizzi et al., 2003; Von Holst et al., 2006; Kreuz et al., 2012).

Eletroforese

As técnicas eletroforéticas e de focalização isoelétrica apresentam bons resultados para a identificação de espécies únicas de carnes não processadas e cruas. Na metodologia de eletroforese, as proteínas cárneas são separadas de acordo com a sua carga elétrica e peso molecular. Para a separação é utilizado um gel de poliacrilamida submetido à passagem de corrente elétrica e as proteínas se movem de acordo com a sua carga nativa em direção ao ânodo ou ao catodo. Assim, é possível correlacionar à distância percorrida pelas proteínas durante a corrida com seu peso molecular, usando como referência um padrão com pesos moleculares conhecidos. Porém, as técnicas eletroforéticas são menos efetivas em misturas de carnes onde mais de uma espécie está presente, e também em amostras que passaram por processamentos térmicos (Patterson e Jones, 1990; Monstowska e Pospiech, 2007).

Na focalização isoelétrica, o gel possui um gradiente de pH e as proteínas depois de submetidas a um agente desnaturante, migram pelo gel até atingir o pH de seu ponto isoelétrico. A diferenciação da espécie baseia-se em proteínas específicas presentes nos diferentes tipos de carnes (Hitchcock e Crimes, 1985; Barai et al., 1992).

Métodos Físico-químicos

Espectroscopia no infravermelho

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho (Espectroscopia IV) baseia-se no espectro de absorbância eletromagnética que ocorre na região perto do infravermelho, definida como os comprimentos de onda entre 780 e 2526 nanômetros (nm). Cada substância possui um padrão de emissão pouco variável devido às ligações atômicas das quais são formadas, que vibram obedecendo basicamente a sua massa atômica e as ligações químicas presentes. A partir da análise do espectro de emissão, da amostra avaliada é possível se obter detalhes das moléculas presentes. É uma técnica rápida e não destrutiva utilizada para diversos fins, podendo ser utilizada para autenticação de comidas como sucos e purês de frutas, mel, leite em pó, peixes e carnes (Leite e Prado, 2012).

A metodologia da espectroscopia IV é rápida, não utiliza reagentes perigosos, precisa de pequenas quantidades de amostra e tem resultados reproduzíveis. Por outro lado, é um método indireto que precisa de uma grande série de resultados de amostras certificadas para a formação de um padrão de referência, a partir do qual se faz a correlação com a amostra que está sendo analisada. A distinção de carnes de diferentes animais (bovinos, suínos, ovinos e aves) pode ser feita pela análise dos principais componentes com nível de classificação correta em torno de 80%. É uma técnica que requer um profissional experiente para o processamento e análise dos resultados (Cozzolino e Murray, 2004; Ceccantini, 2008; Leite e Prado, 2012).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. Vários métodos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram descritos para a identificação de espécies de carnes em produtos derivados. A proporção de dipeptídeos que contém histidina: anserina, balenina e carnosina é característica para cada espécie animal e sua relação pode ser usada para diferenciação de espécies cárneas. Segundo Carnegie et al. (1984) a carne suína possui maior quantidade do dipeptídeo balenina no seu tecido muscular, e a avaliação da relação balenina e anserina (b/a) em proporções iguais ou maiores que 0,05 evidencia altas quantidades dessa carne em uma mistura. Porém,

segundo esses autores, a proporção destes dipeptídeos pode ser diferente nos vários tecidos musculares dos animais e pode mudar de acordo com a idade do animal.

Sawaya et al. (1990), com o objetivo de verificar a eficiência da utilização da relação b/a para diferenciação de espécies de carnes em misturas, adicionaram experimentalmente 0, 1, 3, 5, 10, 30 e 50% de carne suína em carne bovina e verificaram que o método de CLAE foi efetivo na detecção de contaminação a partir de 1%.

Métodos moleculares/genéticos

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) é uma técnica molecular que consiste na amplificação de parte do ácido desoxirribonucléico (DNA) extraído da amostra a ser analisada para a identificação de um determinado organismo. Atualmente é um dos métodos mais usados para detecção de fraudes, pois possui alta sensibilidade e especificidade. Dentre as limitações da técnica estão a necessidade de obter amostras com o material genético íntegro, isto é, em condições de ser amplificado e a presença na amostra de substâncias inibidoras do processo de extração do DNA, o processamento da carne sob altas temperaturas pode ocasionar a fragmentação do DNA aumentando as chances de detecção não específica, substâncias como glicogênio, polissacarídeos, colágeno e produtos da reação de Maillard dificultam a extração. O material genético também não é tecido-específico, não permitindo assegurar que se trata de uma proteína do músculo, do leite ou de miúdos. Outra limitação é a complexidade das amostras, que podem trazer efeitos de matriz que afetam negativamente a precisão e robustez do teste, tornando necessário o desenvolvimento de protocolos para extração de DNA para cada situação particular garantindo extração efetiva. (Gizzi et al., 2003; Woolfe et al, 2004; Liu et al., 2006; Ballin et al., 2009; Ghovvati et al., 2009; Bottero e Dalmasso, 2011).

A técnica de PCR em tempo real tem sido utilizada para a quantificação de adulterações em produtos cárneos. Neste método o número de cópias de fragmento de DNA do “adulterante” é comparado ao número de cópias de fragmento de DNA da espécie que se esperava encontrar num determinado número de ciclos. Porém, não é possível afirmar que a quantidade de fragmento de DNA amplificado reflete a quantidade de carne presente na amostra, pois além do processamento que degrada o DNA, outros ingredientes presentes no alimento interferem no processo de extração do mesmo. Sawyer et al. (2003) utilizaram a metodologia de PCR em tempo real para quantificação de amostras experimentalmente fraudadas, nas seguintes proporções de carne bovina em carne ovina: 0,1; 1; 2; 5; 10; 25; 50 e 100%. Os pesquisadores utilizaram iniciadores

universais (direcionados a regiões conservadas presentes em ambas espécies) e iniciadores espécie-específicos direcionados ao DNA bovino. O resultado obtido não demonstrou a acurácia necessária para determinação da porcentagem de fraude.

Métodos Imunológicos

Os métodos imunológicos surgiram da necessidade em detectar e quantificar moléculas biológicas complexas, quando análises químicas e/ou físicas eram inadequadas ou não estavam disponíveis. Esses métodos baseiam-se nas complexas e específicas interações antígeno-anticorpo, podendo ser usados para detectar determinados抗ígenos em misturas como fluidos biológicos ou extratos de alimentos sem prévia separação. Esta habilidade é uma característica proveitosa para analistas de alimentos interessados em realizar análises em matrizes mais complexas (Patterson e Jones, 1990; Gosling, 2000).

- Anticorpos

Anticorpos também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são glicoproteínas produzidas por animais vertebrados em resposta à introdução de um agente externo (antígeno), possuindo a habilidade de reconhecê-lo de forma específica e ligar-se a parte definida da estrutura molecular do antígeno (Figura 1) (Bonwick e Smith, 2004).

Os anticorpos podem ser produzidos sob o formato de anticorpos monoclonais e policlonais. Anticorpos policlonais são produzidos através das células de defesa do organismo, podendo atuar contra mais de um tipo de antígeno. Estes anticorpos possuem certas desvantagens como, por exemplo, produção limitada, afinidade variável, e vários requisitos para uma extensiva purificação com o objetivo de eliminar uma possível reação cruzada (Billett et al., 1996; Sheu e Hsieh, 1998).

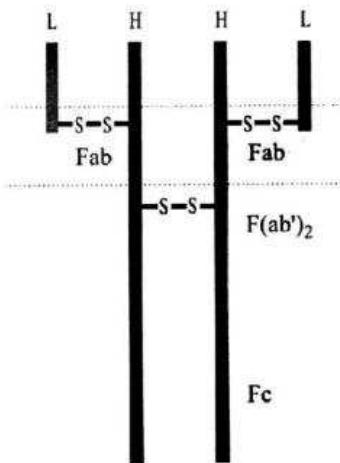


Figura 1. Estrutura geral de um anticorpo. Quatro cadeias de polipeptídeos, duas pesadas (H) e duas leves (L), são estabilizadas e ligadas por pontes dissulfeto (-s-s-) dando à molécula o formato de um Y. A porção inferior da molécula (fração Fc) é própria para ligações. A parte superior [fração F(ab')₂] pode ser subdividida em frações Fab, cada uma possuindo uma cadeia leve e uma cadeia pesada. Na porção final de cada fração Fab está a região que se liga ao epitopo de um antígeno (Bonwick e Smith, 2004).

Os anticorpos monoclonais, por sua vez, constituem uma população homogênea de anticorpos produzidos por hibridomas (células “imortalizadas” por um processo de conjugação de uma célula cancerosa com células do baço de um animal previamente imunizado, geralmente linhagens específicas de camundongos). Os anticorpos monoclonais possuem uma atividade biológica definida, especificidade constante, e produção ilimitada, porém, sua produção é mais difícil, requer técnicas de cultivo celular e devem ser mantidos em ambiente altamente asséptico e em temperatura e atmosfera controladas para manutenção da sua viabilidade (Sheu e Hsieh, 1998; Nagashima et al., 2013).

- Antígenos

Antígenos são definidos como moléculas estranhas que quando introduzidas no organismo são capazes de estimular a resposta imune, ou seja, são substâncias capazes, sob condições apropriadas, de induzirem a formação de anticorpos e de serem reconhecidas especificamente pelos mesmos. No entanto, estudos mostraram que os抗ígenos podem apresentar restrições para demonstrar estas duas propriedades, o tamanho de um antígeno, por exemplo, pode ser uma restrição quanto à sua capacidade de induzir a formação de anticorpos. Estas restrições levaram a redefinição do termo antígeno para imunógeno, que é uma estrutura molecular capaz de induzir a produção de um ou mais anticorpos. Um mesmo imunógeno pode induzir a formação de diferentes

anticorpos por possuir diferentes epitopos, ou determinantes antigênicos (Bonwick e Smith, 2004).

Em contraste com o restrito grupo de proteínas que possuem atividade de anticorpo, uma variedade enorme de macromoléculas pode atuar como antígenos. Os antígenos podem ser quase todas as proteínas, muitos polissacarídeos, nucleoproteínas, lipoproteínas, polipeptídeos e mesmo moléculas menores se conjugadas a uma proteína ou polipeptídeo sintético (Tijssen, 1985).

Tratamentos térmicos são frequentemente usados na elaboração de produtos cárneos, podendo levar a alterações químicas e físicas nas proteínas musculares, como desnaturação e coagulação. Os anticorpos são dirigidos principalmente contra a estrutura conformacional (tridimensional) do antígeno em vez de sítios sequenciais de sua estrutura primária. Marín et al. (1992) avaliaram a associação entre a antigenicidade e a temperatura de tratamento, encontrando uma relação linear entre o aumento da temperatura de tratamento e a diminuição da antigenicidade. Houve perda de 14% de antigenicidade quando o produto foi submetido a temperatura de 40°C por 30 minutos, e de até 70% quando esse binômio passou a 100°C/30 minutos.

Imunodifusão em gel de Agarose (IDGA)

Numa placa com uma fina camada de ágar são feitos poços em que são depositados os antígenos e o anticorpo, que se difundem pelo gel, se o anticorpo for específico para o antígeno, há formação de uma linha opaca de precipitação. Esta técnica já foi utilizada para a identificação de diversas espécies de carnes, porém, apesar de ser uma técnica específica, possui baixa sensibilidade, e não distingue equinos de muares, e ovinos de caprinos. Existem testes comerciais que se baseiam nessa técnica para triagens rotineiras de adulterações (Patterson e Jones, 1990).

Contra imunoelétroforese

A metodologia da contra imunoelétroforese é uma combinação das técnicas de imunodifusão em gel de agarose e eletroforese, e proporciona um resultado mais rápido e mais sensível. Na eletroforese convencional o gel de poliacrilamida tem pH neutro e as proteínas movem-se em direção ao anodo devido a sua carga negativa. Na contra imunoelétroforese o gel é alcalino, fazendo com que as proteínas fracamente negativas, como as imunoglobulinas fiquem carregadas positivamente movendo-se então em direção ao catodo. Dessa maneira as proteínas do extrato de

carne e as imunoglobulinas presentes no antissoro se movem uma em direção à outra formando uma linha opaca de precipitação (Patterson e Jones, 1990).

ELISA

A técnica do ensaio imunoenzimático (ELISA) tornou-se a principal entre muitos ensaios utilizados atualmente. Essa metodologia baseia-se nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. A enzima é covalentemente ligada ao anticorpo específico que reconhece o antígeno alvo. Se o antígeno estiver presente, o anticorpo marcado enzimaticamente irá ligar-se a ele, e a enzima catalisará a reação de um substrato. Essa reação resultará em uma mudança de cor detectável ou na liberação de íons, mudando visivelmente a cor do substrato (Patterson e Jones, 1990; Bonwick e Smith, 2004; Ansensio et al., 2008).

Existem vários tipos de arranjos possíveis para a metodologia de ELISA. No método direto (Figura 2) o antígeno, alvo da mensuração, é immobilizado na placa e um anticorpo marcado enzimaticamente é adicionado à mistura. Se houver ligação antígeno/anticorpo, a enzima catalisa a reação e a extensão da ligação é mensurada pela mudança de cor do substrato. A intensidade da cor resultante pode ser medida em espectrofotômetro pois, quanto mais intensa a cor, maior a quantidade de antígeno ligado a placa (Bonwick e Smith, 2004).



Figura 2. ELISA direto: immobilização do antígeno na placa e adição de anticorpo marcado enzimaticamente (After et al., 2000).

No método indireto (Figura 3) há immobilização do antígeno na placa, seguido da adição de um anticorpo primário que é o alvo da mensuração, posteriormente um anticorpo secundário marcado com a enzima é adicionado.

Essa enzima é responsável pela catalisação da reação do substrato, gerando cor, quanto mais intensa a cor, maior a quantidade de anticorpo primário ligado ao antígeno (Bonwick e Smith, 2004).

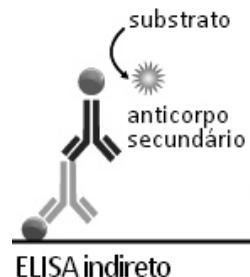


Figura 3. ELISA indireto: imobilização do antígeno na placa com adição de anticorpo primário e anticorpo secundário marcado enzimaticamente (After et al., 2000).

No ELISA sanduíche ou ELISA de captura (figura 4) um anticorpo em quantidade conhecida é imobilizado na placa. Em seguida é adicionado o antígeno, que se deseja mensurar, e posteriormente o anticorpo secundário, marcado enzimaticamente, que catalisará a reação do substrato. Quanto mais intensa a cor, maior a quantidade de antígeno ligado ao anticorpo imobilizado na placa (Bonwick e Smith, 2004).

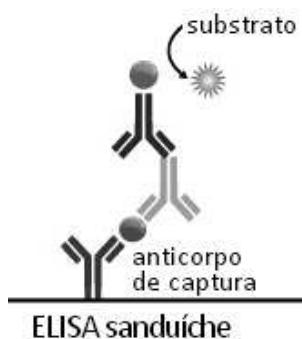


Figura 4. ELISA sanduíche: O anticorpo é imobilizado na placa seguido da adição do antígeno e posteriormente do anticorpo marcado enzimaticamente (After et al., 2000).

Aplicações da metodologia de ELISA para identificação de espécies de carnes em alimentos

Jones e Patterson (1985) utilizaram anticorpos policlonais produzidos em coelhos e ovelhas, para o desenvolvimento de uma metodologia de ELISA sanduíche. Os anticorpos policlonais foram purificados em colunas imunoadsorventes, para aumentar sua especificidade. O objetivo do estudo foi detectar baixas concentrações de espécies de carne em misturas. Amostras de carne

bovina foram fraudadas experimentalmente com carne suína nas proporções de 0; 0,2; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10%. Os autores concluíram que foi possível discriminar até 0,5% de inclusão de carne suína em mistura com a carne bovina.

A metodologia de ELISA sanduíche empregando anticorpos monoclonais e policlonais purificados em coluna de imunoafinidade, foi utilizada por Martín et al. (1991) para estabelecer uma curva padrão de detecção de carne de ave misturada a carne bovina ou suína. Foram utilizadas as proporções de 0; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100% de carne de frango para preparar as amostras fraudadas. O teste foi capaz de correlacionar linearmente à quantidade de carne de ave na mistura e a absorbância.

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia de ELISA capaz de reconhecer especificamente carne mecanicamente separada (CMS) de frango em alimentos de origem animal, Pickering et al.(1995) utilizaram como抗ígenos para a produção de anticorpos, uma fração de proteínas de baixo peso molecular (< 30 kDa) da medula óssea dessa espécie animal. A escolha do uso de proteínas presentes na medula óssea baseia-se no processo de elaboração da CMS, durante o qual os ossos são submetidos a altas pressões, havendo liberação de fluidos de sua estrutura, como células precursoras sanguíneas e outras proteínas. O resultado demonstrou que foi possível quantificar a presença de CMS de frango misturada a carne de peito de frango. Entretanto quando outras partes da carcaça eram utilizadas na mistura em proporções definidas (0, 5, 10, 25, 50 e 100%) havia um incremento da mensuração de absorbância, gerando estimativas de porcentagem de CMS diferentes da concentração real (50, 30, 17, >50, >50, >50%; respectivamente para as proporções citadas anteriormente). De acordo com os autores provavelmente a maior quantidade de sangue residual nessas outras partes, quando comparadas ao peito, tenham desencadeado esse resultado. Foi testada também a interferência de ingredientes não cárneos como trigo e soja, comumente utilizados na fabricação de produtos de origem animal. Observou-se que a adição de trigo não interferiu na mensuração da quantidade de CMS, entretanto a utilização de soja subestimou a quantidade de CMS. Esse resultado pode ser explicado pela ligação das proteínas de soja a placa de ELISA durante a etapa de sensibilização, diminuindo, portanto, a quantidade de CMS imobilizada e mensurada.

A quantificação de carne de frango de corte e peru em carne bovina e suína, respectivamente, foi realizada por Djurdjevic et al., (2005) utilizando anticorpos monoclonais, num teste de ELISA indireto. Os抗ígenos utilizados para imunização foram previamente cozidos (100ºC/ 15 min),

resultando em anticorpos específicos para proteínas solúveis termoestáveis. Ao testar esses anticorpos contra proteínas do soro de aves, cruas não houve reação cruzada. Com proporções de 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100% de carne de frango em carne bovina, esses autores, construíram uma curva padrão capaz de distinguir com exatidão amostras positivas das negativas. Contaminações a partir de 1% foram detectadas. O teste foi capaz de identificar 77 de 80 amostras positivas e 19 de 20 amostras negativas para carne de frango, totalizando 96% de êxito.

Utilizando um par de anticorpos monoclonais dirigidos a proteína termoestável Troponina I, Liu et al.(2006), desenvolveram um ensaio imunoenzimático em formato sanduíche com sensibilidade em detectar até 0,05% de carne suína crua, misturada a carne de frango, em amostras adulteradas em laboratório. Para comparar a efetividade do ensaio para amostras termicamente tratadas, porções de carne suína foram submetidas aos seguintes processamentos térmicos: 100°C/30min (1), 121°C /30min (2), 128°C /30min (3), 132°C /30min (4), 132°C /60min (5), 132°C /90min (6), 132°C /120min (7); e as absorbâncias encontradas comparadas a da carne suína crua. Foi observado que os tratamentos 1,2, 3, 4 e 5 apresentaram uma absorbância maior que a exibida pelo extrato de carne crua, esse aumento foi atribuído ao efeito de concentração dos抗ígenos termoestáveis, uma vez que a maior parte das proteínas extraídas da carne crua são termolábeis e os anticorpos utilizados no ensaio eram dirigidos a uma proteína termoestável.

Marcondes (2011) utilizou anticorpos policlonais dirigidos a proteínas do soro de bovinos, canídeos, coelhos, equídeos e suínos para desenvolvimento de um método de ELISA indireto qualitativo. Para verificar a eficiência do método desenvolvido, o autor utilizou nos ensaios amostras de hambúrgueres obtidos no comércio varejista, com objetivo de aferir a correta rotulagem dos mesmos. As amostras foram separadas em 5 grupos de acordo com a composição e marca, grupo 1: carne bovina e de ave, grupo 2: carne bovina de ave e gordura suína, grupo 3: carne bovina, de aves e suína, grupo 4: carne de ave, grupo 5: carne de ave. Os resultados mostraram que o teste foi eficaz em detectar as diferentes espécies cárneas nas amostras. Foi observado que uma das amostras do grupo 1 não demonstrou reatividade frente ao antissoro bovino, e as amostras do grupo 3 não reagiram com o antissoro de suíno, o autor sugere que esses resultados podem ser reflexo da não utilização da carne de algumas espécies na composição dos hambúrgueres apesar de descritas no rótulo, sendo utilizada alguma outra espécie descrita em substituição.

A síntese de porções espécie-específicas de proteínas animais tem sido utilizada para desenvolvimento de ensaios imunoenzimáticos do tipo sanduíche. Kotoura et al. (2012) utilizaram mioglobina bovina e dois peptídeos (A e B) de dez aminoácidos, sintetizados a partir da sequência N terminal dessa proteína, para a produção de anticorpos monoclonais. A escolha da mioglobina como proteína alvo baseia-se na sua tolerância a tratamentos térmicos e proteinases, comumente utilizados no processo de fabricação de produtos cárneos. A triagem dos anticorpos monoclonais foi feita através de ensaios de ELISA competitivo e utilizados para elaboração de uma curva padrão de concentração de carne bovina, para avaliar se o teste era adequado para a quantificação desta espécie em misturas. A carne suína ou de frango, foi adicionada carne bovina nas proporções de: 10; 1; 0,1 e 0%, e as amostras submetidas a diferentes temperaturas de processamento: temperatura ambiente (TA), 80°C e 120°C por 30 minutos. Utilizando a curva padrão e as absorbâncias observadas os resultados virtuais de contaminação foram: carne suína/10% carne bovina/TA: 9,2%; carne suína/10%carne bovina/80°C: 5,7%; carne suína/10% carne bovina/120°C: 10,3%; carne suína/1% carne bovina/TA: 1%; carne suína/1% carne bovina/80°C: 0,4%; carne suína/1% carne bovina/120°C: 0,7%; carne suína/0,1% carne bovina/TA: 0,2%; carne suína/0,1% carne bovina/80°C: 0,1%; carne suína/0,1% carne bovina/120°C: 0,1%. Carne de frango/10% carne bovina/TA: 13,5%; carne de frango/10% carne bovina/80°C: 4,8%; carne de frango/10% carne bovina/120°C: 6%; carne de frango/1% carne bovina/TA: 0,8%; carne de frango/1% carne bovina/80°C: 0,6%; carne de frango/1% carne bovina/120°C:0,4%; carne de frango/0,1% carne bovina/TA: 0,1%; carne de frango/0,1% carne bovina/80°C: 0,1%; carne de frango/0,1% carne bovina/120°C: 0,1%. Para amostras puras de carne suína ou frango, não houve detecção pelo teste. O coeficiente de variação entre a quantidade real e a aferida pelo teste foi inferior a 5%, os autores consideraram o teste satisfatório para a avaliação da correta rotulagem e quantificação de carne bovina em produtos cárneos.

Após casos de BSE na Europa o uso de proteínas animais para a alimentação de ruminantes foi proibida, diversos testes com o objetivo de detectá-las têm sido desenvolvidos, o único teste aceito pela União Europeia é a microscopia clássica, método que não permite a distinção de espécies, nem quantificação de contaminação. Kreuz et al (2012) com o objetivo de detectar proteínas animais processadas (PAP'S) em ração destinada a alimentação de ruminantes, desenvolveram um teste de ELISA sanduíche. O anticorpo de captura, dirigido contra a proteína osteocalcina, foi obtido comercialmente. A osteocalcina é uma proteína da matriz óssea extracelular secretada pelos osteoblastos. O anticorpo secundário foi feito a partir da imunização de camundongos com

peptídeos sintéticos da porção N terminal da osteocalcina. Afim de obter melhor desempenho dos anticorpos policlonais, estes foram purificados por cromatografia de afinidade, em seguida conjugados a estreptavidina. Segundo os autores a osteocalcina é uma proteína alvo promissora para pesquisa de carne e farinha de carne em ração destinada a ruminantes. Foi possível detectar até 1 ng de osteocalcina desta proteína pelo teste desenvolvido.

A substituição de espécies de carne em alimentos de origem animal é prática cada vez mais comum mundialmente e, com objetivo de verificar a correta rotulagem desses produtos, Cawthorn et al. (2013) analisaram 139 amostras de diferentes produtos obtidos no comércio varejista da África do Sul. Utilizando testes comerciais de análise molecular e imunoenzimáticas, esses autores encontraram carnes de espécies não declaradas em 68% das amostras examinadas, a carne suína (37%) e carne de ave (23%) foram as mais comumente encontradas como substitutas.

Com o propósito de detectar carne equina em produtos cárneos in natura, cozidos e autoclavados Hsieh et al. (2014) utilizaram proteínas termoestáveis extraídas da carne equina, após submetê-la a autoclavagem (121°C/ 1 hora) para a confecção de anticorpos monoclonais. Dentre os hibridomas, foram escolhidos dois clones que secretavam anticorpos reagentes com carne equina crua e autoclavada e não demonstraram reatividade contra carne bovina, suína e de aves. Amostras de carne bovina ou suína foram contaminadas com 0,1; 0,3; 0,5; 1 e 3% de carne equina e utilizadas no teste de ELISA competitivo. De acordo com os autores foi possível estabelecer correlação linear em ampla faixa de concentração 0,1 a 100% de carne equina em carne bovina ou suína, estabelecendo uma curva padrão de inibição, gerada a partir de concentração conhecida do antígeno contra seu percentual de inibição no teste, possibilitando seu uso em amostras desconhecidas.

Para a mistura de carne equina em carne bovina os limites de detecção foram de 0,1; 0,3 e 0,1% para carne crua, cozida e autoclavada respectivamente, para carne suína contaminada com carne equina os limites de detecção foram de 0,5% para carne crua e cozida e de 0,1 para carne autoclavada.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foi elaborada metodologia específica para a identificação de carne de frango de corte em produtos de origem animal. Para o desenvolvimento dos testes foi necessário

a utilização de amostras de soro e músculo de outras espécies animais para realização de ensaios de reatividade cruzada. Os tampões e soluções utilizados nos testes estão descritos no Anexo 1.

Obtenção de amostras

Amostras de soros das diferentes espécies animais utilizados para os ensaios (frango de corte, bovinos, equinos, coelhos e suínos) foram cedidas pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG). Todas as amostras eram de animais saudáveis e em idade adulta. Estas amostras foram utilizadas como fonte de抗ígenos para os ensaios realizados durante a fase experimental do trabalho. As amostras foram separadas em alíquotas de 1 ml cada e submetidas a congelamento em freezer a -20°C e descongeladas apenas no momento do uso.

As amostras de músculos das diferentes espécies animais (frango de corte, bovino, coelho, equino e suíno) foram obtidas no comércio varejista de Belo Horizonte. As amostras de carnes foram utilizadas para obtenção de proteínas cárneas solúveis para os ensaios.

Para a produção de extratos musculares, as amostras de carnes foram trituradas e misturadas a uma solução de Tampão Salino-Fosfato (PBS) 0,1 M até a obtenção de um composto homogêneo. Em seguida, a mistura resultante foi disposta em placas de vidro e aquecidas em estufa a 60°C, overnight para sua secagem. Após a secagem, as amostras foram novamente trituradas e misturadas em solução PBS 0,1 M e filtradas com filtro de papel qualitativo Whatman nº4 obtendo-se um filtrado homogêneo e cristalino. Após estes procedimentos foram realizados ensaios de dosagem de proteínas em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, em seguida os filtrados foram aliquotados em tubos com volumes de 1 ml cada e armazenados em freezer a -20°C até o momento do uso.

Tratamento das amostras

Imunização

Para realização da imunização foram utilizados dois carneiros em idade adulta: um para imunização com soro de frango de corte e o outro para imunização com o extrato muscular de frango de corte. Os animais foram concedidos pela Fazenda São Judas Tadeu, (Fazenda experimental da Fundação Ezequiel Dias, localizada em Betim, MG, Brasil), e antes de cada

inoculação foram coletados sangue dos animais com o objetivo de acompanhar a evolução da imunização, a coleta foi realizada diretamente da veia jugular dos animais (Figura 5).

Para a primeira imunização, o soro e filtrado de músculos previamente descritos foram homogeneizados em adjuvante de Freund completo na proporção de 1:1 (uma parte de adjuvante para uma de soro ou filtrado de músculo), o adjuvante de Freund completo é composto por uma emulsão oleosa em água contendo a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* inativada pela ação do calor ou componentes de sua parede celular e é efetivo em potencializar resposta imune humoral e celular contra imunógenos coadministrados. Nas imunizações subsequentes foi utilizado o adjuvante de Freund incompleto, conservando a mesma proporção, o adjuvante incompleto não possui as micobactérias (Mota et al., 2006).

Os抗ígenos e adjuvante foram homogeneizados e inoculados nos carneiros com o auxílio de seringas de vidro, em doses de 2 ml (Figura 6). As inoculações do soro e filtrado de músculo foram realizados em intervalos de 15 dias, totalizando quatro inoculações. Antes de cada inoculação era retirado cerca de 10 mL de sangue de cada carneiro para acompanhamento da evolução da resposta imune, 14 dias após a última inoculação realizou-se a coleta de 200 mL de sangue de cada um dos animais. O sangue coletado foi coagulado e submetido à centrifugação para a retirada do soro e posterior armazenamento em freezer a -20°C.

Confecção das colunas de imunoafinidade

Os procedimentos descritos para a confecção das colunas de imunoafinidade foram adaptados de Avarameas e Ternynck (1969). As colunas de imunoafinidade (colunas contendo抗ígenos, para posterior ligação com anticorpos) foram confeccionadas com o objetivo de purificar os soros (antimúsculo e antissoro) coletados dos carneiros imunizados.

Para isso, os géis de especificidade foram preparados misturando os抗ígenos, soro ou extrato de músculo de bovinos, coelhos, equinos e suínos, com albumina 1 mg/mL e glutaraldeído 25%, sendo este diluído para a proporção final de 2,5% até a formação de gel, em temperatura ambiente.



Figura 5. Retirada do sangue diretamente da veia jugular dos carneiros.

Preparado o gel, este então foi triturado com uma espátula limpa em PBS 0,1 M até a formação de partículas minúsculas. Em seguida o gel triturado foi centrifugado para separação de líquidos remanescentes. Após a centrifugação, foi adicionado ao gel solução de HCl-Glicina 0,2 M e deixado em repouso por cerca de 10 minutos. Outra centrifugação foi realizada e o pH foi ajustado para 7 com solução de K₂HPO₄1M.

Em seguida lavado três vezes com água destilada, os sítios reativos foram bloqueados com solução de etanolamina 1M em incubação overnight.

Posteriormente o gel foi lavado novamente com PBS 0,1 M. Feito isto, os géis foram separados em colunas distintas e armazenados imersos em tampão de azida sódica 0,01 M, que possui atividade bacteriostática, impedindo a proliferação de micro-organismos. Antes do uso as colunas foram lavadas com PBS 0,1 M para retirada do tampão de azida sódica.

Obtenção de antissoros específicos

Para a produção dos soros específicos (antimúsculo e antissoro), os soros coletados dos carneiros foram adsorvidos nas colunas de imunoafinidade. Os soros (antimúsculo e antissoro) foram diluídos na proporção 1:3 com tampão PBS 0,1 M e passados pelas colunas heterólogas que continham todos os抗ígenos descritos anteriormente, ou seja, soro ou extrato de músculo de

bovinos, coelhos, equinos e suínos, retendo assim todos os componentes presentes no soro (antimúsculo e antissoro) que possuem afinidade com esses抗ígenos.

Deste modo somente os anticorpos específicos para frango de corte foram coletados, após as coletas os soros adsorvidos foram armazenados em tubos cônicos de 15 mL. Para confirmação da eficiência da coleta, foram realizados periodicamente dosagem das proteínas por leitura em espectrofotômetro em 260 e 280 nm.



Figura 6. Imunização com proteínas do músculo e soro de frango de corte.

Teste de especificidade de anticorpos anti-frango de corte

Os testes de especificidades foram realizados através do método de ELISA indireto, foram utilizadas microplacas de 96 poços. Todos os ensaios de ELISA foram realizados em duplicata.

Para os ensaios de ELISA indireto, cada uma das amostras de antígeno foi aliquotada em tampão de sensibilização e na concentração de 0,01mg/mL. A cada poço foram acrescentados 100 µL desta solução e sensibilizados overnight sob refrigeração a 4°C. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas com solução de lavagem e foi acrescentado em cada poço 100 µL de solução de bloqueio. Após estes procedimentos, as microplacas foram incubadas por uma hora a 37°C e lavadas em seguida.

Para a verificação dos títulos de anticorpos tanto os soros puros (antes da adsorção), quanto adsorvidos, foram preparados em solução tampão de incubação e diluídos em série a partir da proporção 1:100 a 1:6400 em cada microplaca. Após a adição do soro (puro ou adsorvido) as microplacas foram incubadas novamente durante uma hora a temperatura de 37°C.

Após a incubação, as microplacas foram lavadas e os poços foram preenchidos com conjugado anti carneiro 1:10000 Sigma®, diluído em solução de bloqueio e levadas a estufa a 37°C por uma hora. Em seguida, as microplacas foram lavadas e preenchidas com 100 µL em cada poço com solução de substrato. As microplacas foram novamente incubadas a 37°C durante 30 minutos, para o desenvolvimento da cor. A reação foi interrompida adicionando-se H₂SO₄ 30% v/v e a intensidade da cor foi medida em Leitor de ELISA a 492 nm.

Preparo das amostras experimentalmente contaminadas

Amostras de carnes foram experimentalmente fraudadas em laboratório com diferentes proporções de carne de frango de corte em carne bovina ou suína (Figura 7).

Amostras experimentalmente contaminadas cruas

Foram preparadas quatro amostras com diferentes percentuais de carne de frango de corte em carne bovina e quatro amostras com diferentes percentuais de carne de ave em carne suína, totalizando oito amostras. As proporções utilizadas foram as seguintes:

- 95% de carne de boi ou porco + 5% de carne de ave;
- 90% de carne de boi ou porco + 10% de carne de ave;
- 65% de carne de boi ou porco + 35% de carne de ave;
- 50% de carne de boi ou porco + 50% de carne de ave.

Foram utilizadas triplicatas de cada uma das oito amostras contaminadas experimentalmente.

A extração das proteínas solúveis de carne crua foi realizada segundo procedimentos descritos por Rafael et al., (2008). Aproximadamente 10 gramas de cada amostra experimentalmente contaminada foi pesada adicionada de 40 mL de água destilada a 4°C e homogeneizadas em agitador eixo-hélice, em seguida o pH foi ajustado a 11,5 com solução de NaOH 1 N a 5°C. Após esse procedimento as amostras foram centrifugadas a 5000 G por 30 minutos sob temperatura de 4°C, separando em três fases: proteínas insolúveis no fundo do tubo, proteínas solúveis na fase intermediária e gordura na superfície (Figura 8). A fase intermediária foi retirada, filtrada, aliquotada e mantida a -20°C, até o uso.

Amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente

Foram preparadas quatro amostras com diferentes percentuais de carne de frango de corte em carne bovina e quatro amostras com diferentes percentuais de carne de ave em carne suína, totalizando oito amostras.

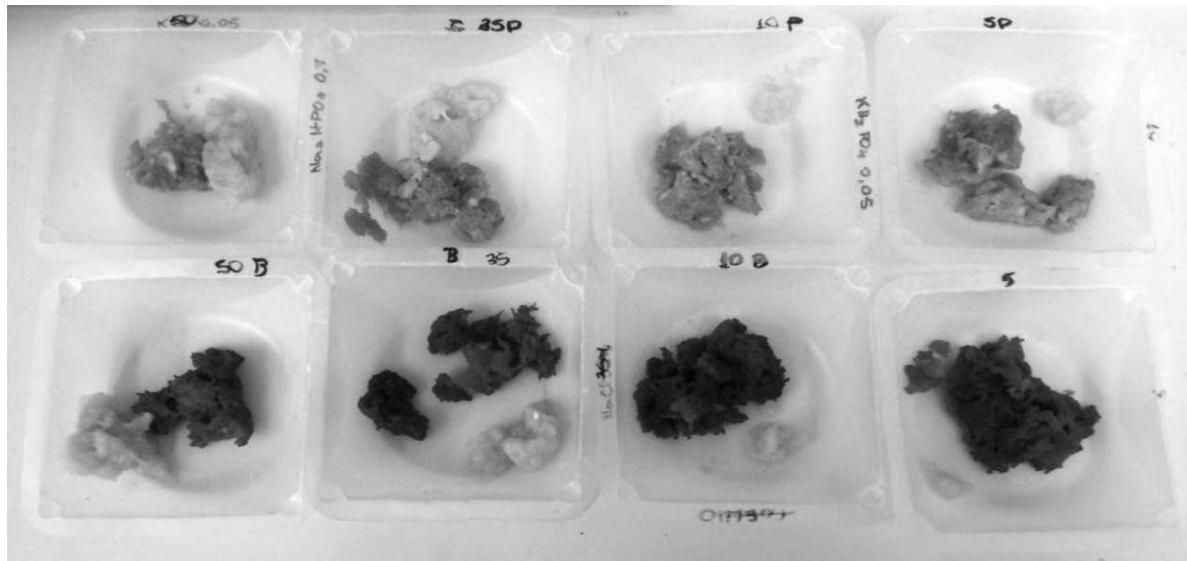


Figura 7. Pesagem das amostras experimentalmente contaminadas em diferentes proporções de carne de frango em carne bovina ou suína.

As proporções utilizadas foram as seguintes: - 95% de carne de boi ou porco + 5% de carne de ave;

- 90% de carne de boi ou porco + 10% de carne de ave;
- 65% de carne de boi ou porco + 35% de carne de ave;
- 50% de carne de boi ou porco + 50% de carne de ave.

Foram utilizadas triplicata de cada uma das oito amostras experimentalmente contaminadas.

Para extração de proteínas solúveis de carne tratada termicamente foram utilizados procedimentos descritos por Djurdjevic et al., (2005). Cerca de 10 gramas das amostras experimentalmente contaminadas foram pesadas e adicionadas de 20 mL de PBS 0,1 M em seguida colocados em banho maria a 100°C por 15 minutos para desnaturação das proteínas. Após a retirada do banho maria as amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em agitador eixo-hélice. Em seguida foram deixadas decantar por 2 horas sob temperatura de 4°C. Posteriormente as amostras foram

centrifugadas por 30 minutos a 15000 G, mantendo a temperatura de 4°C. Para os ensaios, o sobrenadante foi retirado e filtrado em papel filtro, aliquotado e mantido a- 20°C, até o uso.

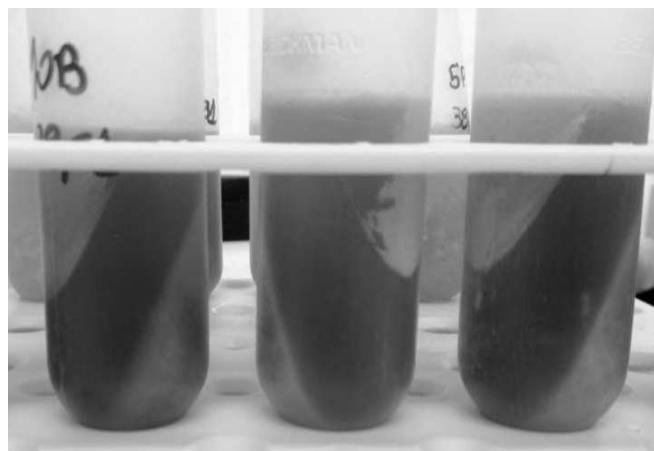


Figura 8. Separação das proteínas solúveis em amostras experimentalmente fraudadas de carne crua.

ELISA indireto para amostras experimentalmente contaminadas

Para os ensaios de ELISA indireto, cada uma das amostras de antígeno foi aliquotada em tampão de sensibilização na concentração de 0,01mg/mL. A cada poço foram acrescentados 100 µL desta solução e sensibilizados overnight, sob refrigeração a 4°C. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas com solução de lavagem e foi acrescentado em cada poço 100 µL de solução de bloqueio. Após estes procedimentos, as microplacas foram incubadas por uma hora a 37°C e lavadas em seguida.

Posteriormente os anticorpos adsorvidos, foram preparados em solução tampão de incubação na proporção de 1: 1500. Após a adição do soro adsorvido, as microplacas foram incubadas novamente durante uma hora a uma temperatura de 37°C.

Após a incubação, as microplacas foram lavadas e os poços foram preenchidos com conjugado anti carneiro 1:10000 Sigma®, diluído em solução de bloqueio e levadas a estufa a 37°C por mais uma hora. Em seguida, as microplacas foram lavadas e preenchidas com 100 µL em cada poço com solução de substrato. Após 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 30% v/v, e lidas em leitor de microplacas de ELISA a 492 nm.

Testes em alimentos processados (Hambúrgueres)

Para a realização dos testes em alimentos processados, amostras de hambúrgueres de diferentes marcas e composição, foram adquiridas no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram separadas em dois grupos: grupo um: carne bovina, gordura suína e carne de aves e grupo dois: carne de frango totalizando doze amostras de duas diferentes marcas. Para o preparo da amostra, cerca de 5 gramas de cada hambúrguer foi pesado e adicionado de tampão PBS 0,1 M e trituradas até a obtenção de uma mistura homogênea, e deixadas em repouso por uma hora, para decantação das partículas sólidas. Em seguida centrifugadas a 5000 G e filtradas em papel filtro Whatman nº 4 até a obtenção de um filtrado cristalino. Posteriormente as amostras foram submetidas a dosagem de proteínas em espectrofotômetro a 260 e 280 nm. Em seguida, as amostras foram aliquotadas e preservadas a temperatura de – 20º C.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial 2 x 2 x 4, sendo dois tipos de espécies de carne (bovina e suína), dois tipos de processamentos (carne crua e tratada termicamente) e quatro níveis de adição de carne de frango (cinco, 10, 35 e 50%) totalizando 16 tratamentos para avaliação da metodologia desenvolvida. Para avaliação dos níveis de adição de carne de frango nas amostras cruas e processadas termicamente foram utilizados modelos de regressão linear.

Para avaliação da detecção de carne de frango em amostras de hambúrgueres foram utilizados dois tratamentos (duas marcas diferentes de hambúrgueres) com seis repetições cada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Título de anticorpos

Os títulos de anticorpos antimúsculo e antissoro alcançados com o ciclo de imunizações com soro e músculo de frangos de corte estão representados na figura 9. Alcançar altos títulos de anticorpos é fator primordial para assegurar que as imunizações estão sendo efetivas. As absorbâncias (unidade de medida usada para determinar concentrações) encontradas alcançaram valores superiores a 3,5 em diluição de 1:100 em ambos os anticorpos (antimúsculo e antissoro)

diminuindo a valores próximo de 1 em diluição de 1:6400. Esses valores mostraram-se bem maiores que aqueles observados para o soro pré-imune, que alcançou absorbância de 0,136 na diluição de 1:100 atingindo valor bem próximo a zero à medida que a diluição foi aumentando.

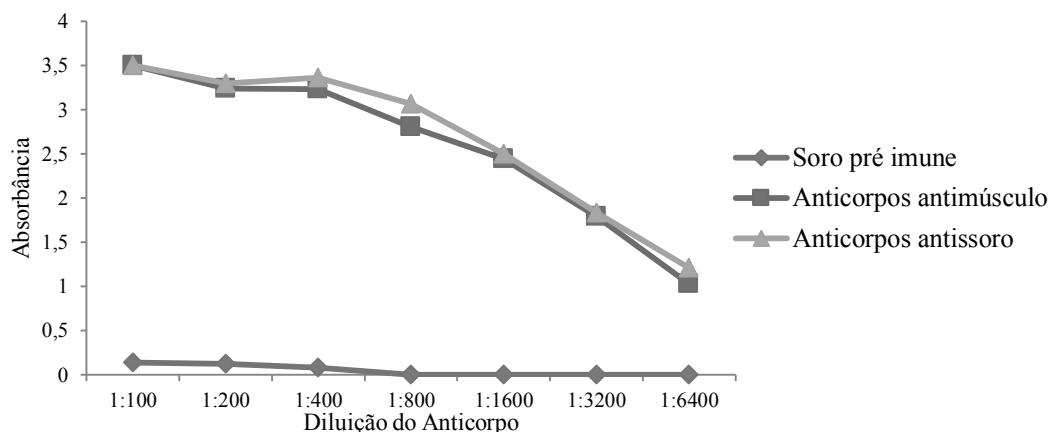


Figura 9: ELISA indireto. Título de anticorpos do soro coletado antes do início das imunizações (soro pré-imune) e após o ciclo de imunizações submetido a diluições sucessivas (1:100 a 1:6400)

Adsorção dos anticorpos em coluna heteróloga de imunoafinidade

A adsorção em coluna heteróloga tem por objetivo a retirada de componentes que reagem inespecificamente, com o antígeno utilizado nas imunizações. Na figura 10 é demonstrado a reatividade do soro antimúsculo frente ao extrato de proteínas musculares de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suínos. O soro antimúsculo demonstrou alta reatividade contra o extrato de músculo de frango de corte, alcançando absorbância de até 0,756 em diluição de 1:100. Frente aos extratos de músculo de outras espécies a maior absorbância foi observada contra suíno com valor de 0,173 na menor diluição (1:100).

Jones e Patterson (1985) utilizaram colunas imunoadsorventes para purificação de anticorpos policlonais produzidos em coelhos e ovelhas dirigidos contra carne suína, o teste desenvolvido foi efetivo na detecção de 0,5% de carne suína em carne bovina. Martín et al., (1991) e Kotoura et al., (2012) utilizaram colunas de imunoafinidade para purificação de soros policlonais, para aumento da especificidade em ensaios de ELISA sanduíche. Resultados semelhantes foram encontrados por Marcondes (2011), ao utilizar colunas de imunoafinidade para verificar a

reatividade dos soros utilizados, também atestou um aumento da especificidade dos anticorpos utilizados para comprovação da composição de produtos cárneos.

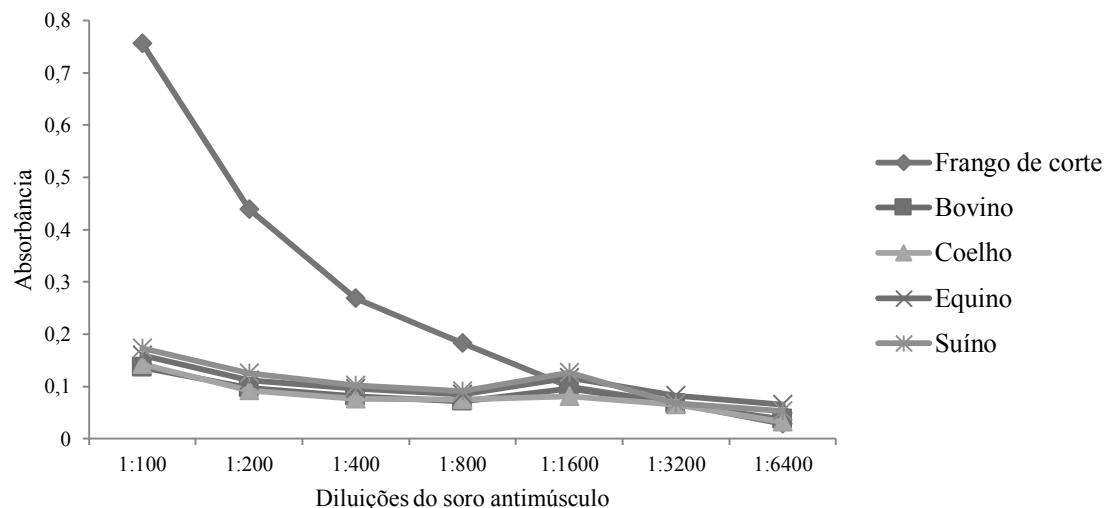


Figura 10. ELISA indireto. Reatividade do soro antimúsculo adsorvido em coluna de imunoafinidade heteróloga frente extrato de músculo de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suínos.

O resultado da adsorção em coluna de imunoafinidade do antissoro está apresentado na figura 11. O antissoro demonstrou alta reatividade com o soro de ave com absorbância de até 2 na menor diluição (1:100), entretanto houve também uma alta reação cruzada com o soro de suíno com valores de 0,723 na diluição de 1:100, impossibilitando o uso nos ensaios posteriores. A interferência em imunoensaios de substâncias presentes nas amostras foi discutida por Schietecatte et al., (2012), a presença de lipídios, triglicerídeos ou colesterol no soro interfere na ligação antígeno-anticorpo, podendo superestimá-la, esses autores recomendam a coleta sanguínea pós jejum reduzindo a lipemia.

Amostras experimentalmente contaminadas cruas

Foi observado que o aumento da porcentagem de contaminação correlaciona-se significativamente com aumento da absorbância. As equações de regressão da porcentagem de carne de frango adicionada à carne bovina e suína em função da absorbância e sua representação gráfica estão apresentadas nas figuras 12 e 13. Essa relação pode ser usada para quantificação de fraudes entre 5 e 50%, no entanto ligeiras variações nas curvas padrão podem ocorrer, é prudente padronizar os ensaios utilizando amostras conhecidas antes de avaliar amostras desconhecidas.

Para a quantificação de proteína de uma dada espécie em amostras contendo várias espécies cárneas, é aconselhável construir uma curva padrão em que todas estejam presentes, minimizando o efeito matriz. Esses resultados assemelham aos encontrados por Martín et al. (1991), esses autores propuseram a quantificação da carne de ave em carne bovina ou suína, utilizando metodologia de ELISA sanduíche, obtendo correlação linear e resultados satisfatórios para predições de fraude entre 1 e 100%.

Djurdjevic et al., (2005) observaram correlação positiva entre o aumento da contaminação de carne bovina com carne de frango de 0 a 100%, e o aumento da absorbância utilizando teste de ELISA indireto, utilizando anticorpos monoclonais.

Amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente

A avaliação dos anticorpos antimúsculo em detectar proteínas de frango de corte em amostras experimentalmente contaminadas tratadas termicamente é demonstrada na tabela 1. Foi observado que os antissoros foram efetivos na identificação das proteínas musculares de frango, apesar de haver diferença entre as repetições das amostras com a mesma porcentagem de contaminação, não foi possível estabelecer correlação entre as porcentagens de fraude e a absorbância mensurada.

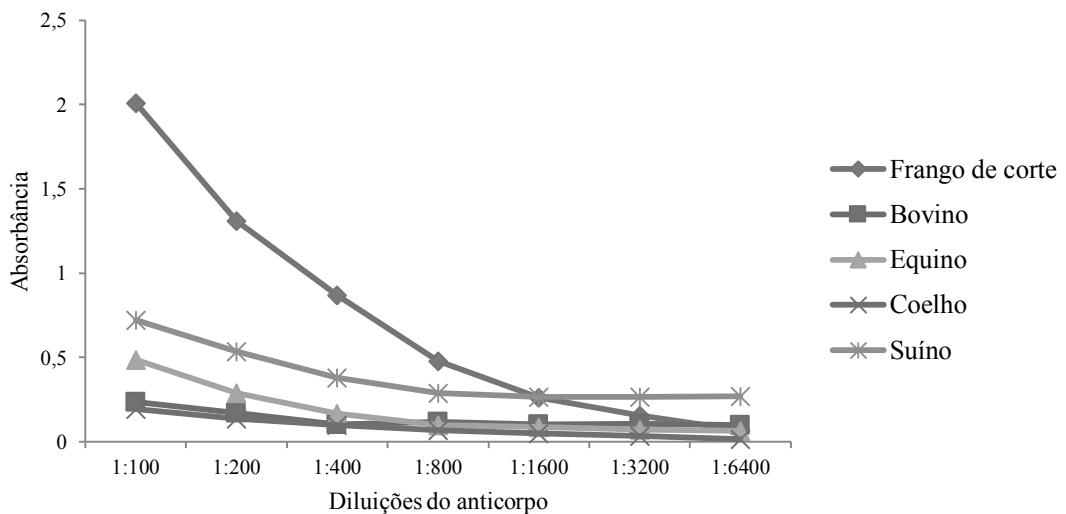


Figura 11. ELISA indireto. Reatividade do soro antissoro adsorvido em coluna de imunoafinidade heteróloga frente soro de frango de corte, bovinos, coelhos, equinos e suíños.

A perda de antigenicidade pode ser explicada pela perda dos epitopos conformacionais ocasionado pelo cozimento que desnaturou as proteínas fazendo com que as mesmas perdessem sua estrutura terciária, pois quando se perde a complementariedade entre antígeno e anticorpo não há reconhecimento, nem ligação.

Constatação semelhante ao do presente trabalho foi encontrada por Liu et al., (2006) utilizando proteína Troponina I para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais. Esses autores observaram variação da antigenicidade com aumento da intensidade do tratamento térmico aplicado às amostras de carne suína. Concluindo que não foi possível correlacionar a perda da antigenicidade e o tratamento térmico utilizado.

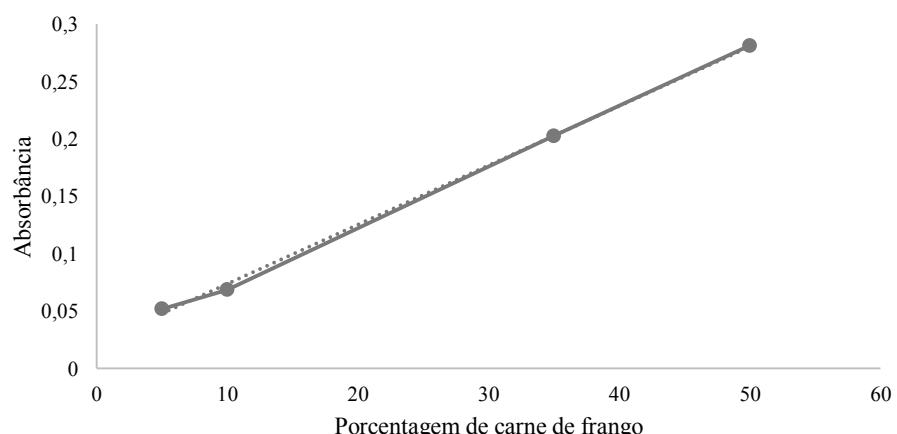


Figura 12- Equação de regressão linear obtida com concentrações de 5 a 50% de carne de frango em carne bovina. A equação é expressa estatisticamente por $y= 0,0052x + 0,0217$, $r^2 = 0,9988$, onde o y é a absorbância e o x é a concentração de carne de frango.

Utilizando anticorpos policlonais e monoclonais dirigidos contra a proteína termoestável osteocalcina Kreuz et al., (2012) desenvolveram um teste de ELISA sanduíche, efetivo na detecção qualitativa de farinha de ossos bovino em ração autoclavada destinada a alimentação de ruminantes.

Empregando carne bovina para analisar o efeito de tratamentos térmicos na desnaturação de proteínas animais, Marín et al., (1992) verificaram correlação linear entre a perda de antigenicidade das proteínas musculares e a intensidade dos tratamentos térmicos.

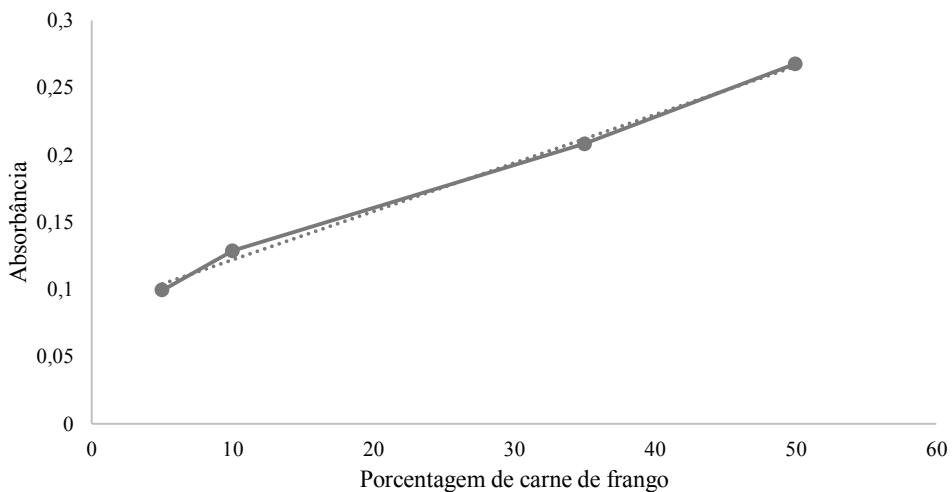


Figura 13. Equação de regressão linear foi obtida com concentrações de 5 a 50% de carne de frango em carne suína. A equação é expressa estatisticamente por $y = 0,0036x + 0,086$, $r^2 = 0,9953$, onde o y é a absorbância e o x é a concentração de carne de frango.

Objetivando quantificar contaminação de carne bovina em carne suína ou de aves, Kotoura et al., (2012) desenvolveram um teste capaz de predizer a concentração do contaminante independente do tratamento térmico a que as amostras foram submetidas. Com coeficiente de variação entre a quantidade real e a quantidade mensurada a partir do teste, inferior a 5%.

O uso de antígenos previamente tratados termicamente para a obtenção dos anticorpos pode trazer resultados satisfatórios na pesquisa de fraude em alimentos submetidos a tratamentos térmicos. Hsieh et al., (2014) pesquisaram a presença de carne equina em alimentos crus, cozidos e autoclavados, utilizando anticorpos monoclonais. Esses anticorpos foram desenvolvidos a partir de proteínas solúveis de carne equina autoclavada. Para amostras cruas houve alta reação cruzada dos anticorpos utilizados com carnes de ganso, pato e frango, porém, quando as amostras eram cozidas ou autoclavadas esses resultados não foram observados. Os autores sugerem que as proteínas antigênicas reconhecidas na carne crua foram inativadas pelo tratamento térmico realizado. Segundo os autores foi possível estabelecer uma curva padrão de concentração de proteína solúvel equina e absorbância, para fraudes em carne bovina ou suína, observando pequena variação na curva padrão dependendo da matriz utilizada.

Tabela 1. Porcentagem de carne de frango em amostras experimentalmente contaminadas e absorbâncias observadas em ELISA indireto.

Frango %	Absorbância - Carne Bovina			Absorbância - Carne Suína			Controles		
	Repetição		Repetição	Repetição	Repetição		Frango	Bovino	Suíno
	I	II	III	I	II	III			
5	0,13	0,044	0,178	0,193	0,1597	0,202	1,089	0,007	0,006
10	0,098	0,029	0,19	0,179	0,1945	0,231			
35	0,1545	0,067	0,252	0,1645	0,178	0,2267			
50	0,221	0,098	0,461	0,194	0,1397	0,243			

Testes em amostras de hambúrgueres

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para hambúrgueres, o mesmo deve ser denominado hambúguer seguido do nome espécie animal do qual é feito, permitindo-se adição máxima de proteínas não cárneas de quatro por cento. A tabela 2 demonstra os resultados obtidos nos testes realizados com as amostras de hambúrgueres. As amostras foram separadas segundo sua marca e composição, as amostras do grupo um, são descritas no rótulo como compostas por carne bovina, gordura suína e carne de ave, enquanto as amostras do grupo dois, são rotuladas como contendo apenas carne de frango. O teste demonstrou eficiência na detecção de carne de frango em amostras industrializadas, entretanto não foi possível quantificar as proteínas cárneas de frango, devido a interferência da matriz. Observou-se que os títulos obtidos no grupo um foram mais baixos que aqueles do grupo dois o que pode ser explicado pela diferença entre a composição dos mesmos. A variação de título observada dentro dos grupos pode ser interpretada por diferentes quantidades de gordura e ou adição de proteínas não cárneas ou ainda de outras espécies animais.

Segundo Pickering et al., (1995) a presença de proteínas de soja pode interferir na mensuração da absorbância, subestimando-a, devido a diminuição da imobilização de proteínas animais em razão da ligação da proteína vegetal a placa de ELISA.

Tabela 2: Absorbâncias das amostras de hambúrgueres. Compostas por: grupo um: carne bovina, gordura suína e carne de aves; grupo 2: carne de aves.

Grupos	Número da amostra	Absorbância
Grupo 1	6214	0,022
	7474	0,032
	7484	0,031
	7489	0,020
	7490	0,054
	7501	0,032
Grupo 2	7483	0,222
	7494	0,139
	7495	0,150
	7496	0,156
	7497	0,222
	7498	0,266

CONCLUSÕES

A purificação de anticorpos monoclonais em colunas de imunoafinidade foi eficiente na retirada de componentes inespecíficos, que reagiam com outras espécies animais, resultando em um pool de anticorpos específicos para proteínas de frango de corte, possibilitando o desenvolvimento de um teste de ELISA indireto eficiente na detecção de proteínas de carne de frango de corte. Para as amostras experimentalmente contaminadas cruas houve ajuste dos dados ao modelo de regressão linear apresentando coeficiente de determinação acima de 0,99 mostrando-se adequado para quantificação de carne de frango em carne bovina ou suína em porcentagens de 5 a 50% de contaminação. Em amostras termicamente tratadas foi possível classificá-las, de modo qualitativo, quanto a presença ou ausência de carne de frango. Ao testar amostras de hambúrgueres comerciais o ensaio foi seletivo na detecção de proteínas cárneas de frango de corte, na presença de proteínas cárneas de outras espécies animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTER R. A.; GOLDSBY, T. J.; KINDT, B. A. **Kuby Immunology**, 4th ed. (W. H. Freeman and Company), p. 162. 2000.

ASENSIO, L.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T; MARTÍN, R. Determination of Food Authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **FoodControl**, v.19, p.1-8. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEINA ANIMAL. Relatório Anual da Associação Brasileira de Avicultura. 106p. 2014.

AVARAMEAS, S.; TERNYNCK, T. The cross-linking of protein with glutaraldehyde and its use for preparation of immunoadsorbents. **Immunochemistry**, v.6, p.43-52. 1969.

BALLIN, N. Z.; VOGENSEN, F.K.; KARLSSON, A. H. Species Determination – Can we detect and quantify meat adulteration? **Meat Science**, v.83, p.165-174. 2009.

BARAI, B. K.; NAYAK, R. R.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Approaches to the detection of meat adulteration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p.69-72. 1992.

BILLETT, E. E, BEVAN, R.; SCANLON, B.; PICKERING, K.; GIBBONS, B. The use of a poultry-specific murine monoclonal antibody directed to the insoluble muscle protein desmin I meat speciation. **Journal of Science Food Agriculture**, n.70, p.396-404. 1996.

BONWICK, G.A; SMITH, C. J. Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. **International Journal of Food Science and Technology**, n.39, p.817-827. 2004.

BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A. Animal Species Identification in Food Products: Evolution of biomolecular methods. **The Veterinary Journal**, v.190, p. 34-38. 2011.

BRASIL. Lei nº 6437 de 20 de agosto de 1977. **Configura infrações à legislação sanitária federal, estabelece as sanções respectivas e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1977.

BRASIL. Lei nº 8078 de 11 de setembro de 1990. **Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 de Setembro de 1990.

BRASIL. Decreto nº 6385 fev. 2008. Dá nova redação aos arts. 854 e 918 do **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**, aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 fev. 1997, 2008.

BRASIL. Decreto Lei nº2848 de 7 de Dezembro de 1940. **Código Penal Brasileiro**. Redação dada pela Lei 9677 de 2 de Julho de 1998. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 7 de Julho de 1998, 1940.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução **normativa nº 22, de 24 de Novembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal Embalado**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p.15, 25 de novembro de 2005. Seção 1. 2005.

CARNEGIE, P.R.; ILIC, M.Z.; ETHERIDGE, M.O.; et al. Use of histidine dipeptides and myoglobin to monitor adulteration of cooked beef with meat from other species. **Australian Vet Journal**, v.62 (8), p.272-276. 1984.

CAWTHORN, D-M.; STEINMAN, H.A. HOFFMAN, L.C. A high incidence of species substitution and mislabeling detected in meat products sold in South Africa. **Food Control** 32, p.440-449. 2013

CECCANTINI, M. L. Novas técnicas e tecnologias na análise de alimentos aplicados à formulação (NIRs). In: **Seminário de Nutrição Animal**. Curitiba, 2008.

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Disponível em: <<http://www.cna.gov.br/>>. Acesso em 5 de dezembro de 2013

REGULAMENTO EC/2003/126. Commission Directive establishing guidelines for microscopic identification and estimation of constituents of animal origin for the official control of feeding stuffs. Official Journal of the European Communities. 27 de Novembro de 2003. L.318, p.45 – 50. 2003.

COZZOLINO, D.; MURRAY, I. Identification of animal meat muscle by visible and near infrared reflectance spectroscopy. **Lebensm. – Wiss. u. - Technol.** n.37, p. 447-452. 2004.

DJURDJEVIC, N.; SHEU, S-C; HSIEH Y-H. P. Quantitative Detection of Poultry in Cooked Meat Products. **Journal of Food Science**.v.70, nº9, p.586-593.2005.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em :<<http://www.fao.org/>>Acesso em 15 de Dezembro de 2013.

FLORES-MUNGUIA, M. E.; BERMUDEZ-ALMADA, M. C.; VÁSQUEZ-MORENO, L. A research note: Detection of Adulteration in Processed Traditional Meat Products. **Journal of Muscle Foods**, v.11, p. 319-325. 2000.

GHOVVATI, S.; NASSIRI, M. R.; MIRHOSSEINI, S. Z.; MOUSSAVI, A. H.; JAVADMANESH, A. Fraud Identification in Industrial Meat Products by multiplex PCR assay. **Food Control**, v.20, p.696-699. 2009.

GIZZI, G.; VON HOLST, C.; BAETEN, V.; et al. Intercomparisson study for the determination of processed animal proteins including meat and bone meal in animal feed. **Relatório final de contrato administrativo nº B5-1000/02/000483. JCR-IRMM**, 100p. 2003.

GOSLING, J. P. Immunoassays: A Practical Approach. **Oxford University Press**, Oxford. 304 p. 2000.

HITCHCOCK, C. H. S.; CRIMES, A. A. Methodology for meats species identification: a review. **Meat Science**, n.15, p.215-224. 1985.

HSIEH, Y. P.; WOODWARD, B. B.; HO, S.H. Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassay. **Journal of Food Protection**, v.58, p. 555-559. 1995.

HSIEH, Y. P.; OFORI, J. A. Detection of horse meat contamination in raw and heat-processed meat products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 12536-12544. 2014.

JONES, S. J.; PATTERSON, R. L. S. Double-Antibody ELISA for Detection of Trace Amounts of Pig Meat in Raw Meat Mixtures. **Meat Science**. n.15, p. 1-13. 1985.

KOTOURA, S.; MURAKAMI-YAMAGUCHI, Y.; KIZU, K.; NAKAMURA, M.; FUCHU, H.; MIAKE, K.; SUGIYAMA, M.; NARITA, H. Establishment of a sandwich ELISA for the determination of beef content in processed foods by using monoclonal antibodies to myoglobin. **Food and Agricultural Immunology**. v. 23, p. 289-301. 2012.

KREUZ, G.; ZAGON, J.; BROLL, H.; BERNHARDT, C.; LINKE, B.; LAMPEN, A. Immunological detection of osteocalcin in meat and bone meal: a novel heat stable marker for the investigation of illegal feed adulteration. **Food Additives and Contaminants**. v. 29, p. 716-726. 2012.

LEITE, D. O.; PRADO R. J. Espectroscopia no Infravermelho: Uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira Do Ensino De Física**, v.34, n.2, 2504. 2012.

LIU, L.; CHEN, F.; DORSEY, J. L.; HSIEH, Y. H. P. Sensitive monoclonal antibody-based sandwich ELISA for the detection of porcine skeletal muscle in meat and feed products. **Food Microbiology and Safety**, v. 71, p.1-6. 2006.

MARCONDES, G. A. Produção de antissoros específicos para detecção e identificação específica de carnes em alimentos. 55f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2011.

MARÍN, M. L.; CASAS, C.; CAMBERO, M. I.; SANZ, B. Study of the effect of heat (treatments) on meat protein denaturation as determined by ELISA. **Food Chemistry**, n.43, p. 147-150. 1992.

MARTÍN, R.; WARDALE, R. J; JONES, S. J.; HERNÁNDEZ, P. E.; PATTERSON, R. L. S. Monoclonal antibody sandwich ELISA for the potential detection of meat in mixtures of raw beef and pork. **Meat Science**, n. 30. p. 23-31. 1991.

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, n.16, p. 79-88. 2006.

MONTOWSKA, M.; & POSPIECH, E. Species identification of meat by electrophoretic methods. **ACTA Scientiarum Polonorum- Technologia Alimentaria**, v.6. p. 5-16. 2007.

NAGASHIMA, H.; WATARI, A.; SHINODA, Y.; OKAMOTO, H.; TAKUMA, S. Application of a quality by design approach to the cell culture process of a monoclonal antibody production, resulting in the establishment of a new design space. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.102, p.4274-4283.2013.

PATTERSON, R.L.S.; JONES, S.J. Review of current techniques for the verification of the species origin of meat. **Analyst**, v.115, p.501-506, 1990.

PICKERING, K. G.; GRIFFING, M.; SMETHURST, P.; HARGIN, K.D.; STEWART, C. A. Investigations of Methods to Detect Mechanically Recovered Meat in Meat Products – IV: Immunology. **Meat Science**. n.40. p.327-336. 1995.

RAFAEL, R.; MORAES, K.; HERNANDEZ, C. P.; FLORES, J.; SIMÕES, L. Extração de proteínas de frango por solubilização alcalina. **X Encontro de pós Graduação da Universidade Federal de Pelotas**. 2008.

SAWAYA, W. N.; SAEED, M. M.; MAMEESH, M.; EL-RAYES, E.; HUSAIN, A.; ALI, S.; ABDUL RAHMAN. Detection of pork in processed meat: experimental comparison of methodology. **Food Chemistry**. v. 37. p. 201-219. 1990.

SAWYER, J.; WOOD, C.; SHANAHAN, D.; GOUT, S.; McDOWELL, D. Real-time PCR for quantitative meat species testing. **Food Control**. n. 14. p. 579-583. 2003.

SCHIETTECATTE, J.; ANCKAERT, E.; SMITZ, J. Interferences in Immunoassays. **Advances in Immunoassay Technology**, Dr. Norman H. L. Chiu (Ed) InTech. Disponível em:
<http://www.intechopen.com/books/advances-in-immunoassay-technology/interference-in-immunoassays> Bélgica, 2012

SHEU, S-C.; HSIEH, Y-H. P. Production and Partial Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to Cooked Poultry Meat. **Meat Science**, v.50, nº 3, p.315-326. 1998.

TIJSSEN, P. The Nature of immunogens, antigens and haptens. In: **Practice and Theory of Enzyme Immunoassay**. p. 39-41. Amsterdam. 1985.

VON HOLST, C.; BOIX, A.; BAETEN, V.; VANCUTSEM, J.; BERBEN, G. Determination of processed animal proteins in feed: The performance characteristics of classical microscopy and immunoassay methods, **Food Additives and Contaminants**. n.23, p. 252-264. 2006.

WOOLFE, M.; PRIMROSE, S. Food forensics: Using DNA technology to combat misdescription and fraud. **Trends in Biotechnology**, nº. 22, p.222-226. 2004.

ANEXO I
TAMPÕES E SOLUÇÕES

PBS 1 M pH 7,4

NaCl	80,0 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	28,0 g
KCl	2,0 g

Completar para um litro em água destilada .

COATING BUFFER – TAMPÃO CARBONATO/BICARBONATO – 0,05M pH 9,6 (Tampão de Sensibilização)

Na ₂ CO ₃	1,59 g (0,015M)
NaHCO ₃	2,93 g (0,035M)

Completar para um litro em água destilada. Ajustar o pH com a adição de solução salina monobásica ou dibásica.

SOLUÇÃO DE LAVAGEM (PRONTA PARA USO)

NaCl	9,0 g
Tween – 20	0,5 ml
H ₂ O (destilada)	1,0 L

Obs.: adicionar o Tween-20 após dissolver o NaCl.

SOLUÇÃO DE BLOQUEIO – CASEÍNA

Caseína 2,0 g

Dissolver a caseína em 100 ml de PBS 0,05M pH 7,4.

Aquecer para facilitar a dissolução.

TAMPÃO DE INCUBAÇÃO – PBS 0,1M + TWEEN-20 0,1 %

PBS 0,1M 1,0 L

Tween-20 1,0 ml

TAMPÃO CITRATO 0,15M pH 5,0

Ácido Cítrico 7,3 g

Na₂HPO₄.2H₂O 11,86 g

Dissolver em um litro de água destilada, ajustar o pH para 5 com a adição de ácido ou salina dibásica.

SOLUÇÃO SUBSTRATO (OPD)

OPD 5mg

Tampão Citrato 12,5 mL

H₂O₂ (Peróxido de Hidrogênio) 30% v/v 5 µL

Dissolver OPD no tampão citrato e em seguida adicionar a solução de peróxido de hidrogênio, utilizar 100 µL em cada poço da microplaca.

SOLUÇÃO SALINA

NaCl	8,5 g
H ₂ O (destilada)	1,0 L

ETANOLAMINA 1,0 m pH 8,0

Etanolamina	3,0 ml
H ₂ O (destilada)	20 ml
Ajustar o pH com HCl e completar o volume para 50 ml.	

SOLUÇÃO DE NaOH 1M

NaOH	4 g
Dissolver em 100 mL de água destilada.	



US006288215B1

(12) **United States Patent**
Hsieh(10) **Patent No.:** US 6,288,215 B1
(45) **Date of Patent:** Sep. 11, 2001(54) **MONOCLOINAL ANTIBODIES SPECIFIC TO COOKED MEATS**(75) Inventor: **Y-H. Peggy Hsieh**, Auburn, AL (US)(73) Assignee: **Auburn University**, Auburn, AL (US)

(*) Notice: Subject to any disclaimer, the term of this patent is extended or adjusted under 35 U.S.C. 154(b) by 0 days.

(21) Appl. No.: **08/906,851**(22) Filed: **Aug. 6, 1997****Related U.S. Application Data**

(60) Provisional application No. 60/024,887, filed on Aug. 30, 1996.

(51) **Int. Cl.⁷** **C12P 21/08**(52) **U.S. Cl.** **530/388.2; 530/387.1; 436/548; 435/332**(58) **Field of Search** **530/388.2, 387.1; 436/548; 435/332; 424/141.1, 152.1**(56) **References Cited****U.S. PATENT DOCUMENTS**

5,312,751 * 5/1994 Michel et al.

5,338,661 * 8/1994 Jensenius et al..

OTHER PUBLICATIONS

Antibody Development and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Protein Marker Lactate Dehydrogenase to Determine Safe Cooking End-Point Temperatures of Turkey Rolls, Cheng-Hsin Wang, Mohamed M. Abouzied, James J. Pestka, and Denise M. Smith, Department of Food Scidence and Human Nutrition, Michigan State University, East Lansing, Michigan (J. Agric Food Chem. 1992, 40 1671-1676).*

Lactate Dehydrogenase as Safe Endpoint Cooking Indicator in Poultry Breast Rolls: Development of Monoclonal Antibodies and Application to Sandwich Enzyme-Linked Immunosobent Assay (ELISA), Mohamed M. Abouzied, Cheng Hsing Wang, James J. Pestka, and Denise M. Smith, Department of Food Service and Human Nutrition, Michigan State University, East Lansing, Michigan, (Journal of Food Protection, vol. 56, No. 2, pp. 120-124, Feb. 1993).*

Lactate Dehydrogenase, Serum Protein, and Immunoglobulin G Content of Uncured Turkey Thigh Rolls as Influenced by Endpoint Cooking Temperatures, Cheng-Hsin Wang, James J. Peska, Alden M. Booren, and Denise M. Smith, Department of Food Science and Human Nutrition, Michigan State University, East Lansing, Michigan (J. Agric. Food Chem. 1994, 42, 1829-1833).*

Cooking Temperature of Turkey Ham Affects Lactate Dehydrogenase, Serum Albumin and Immunoglobulin G as Determined by ELISA, D.M. SMith, L.D. Desrocher, A.M. Booren, C.H. Wang, M.M. Abouzied J.J. Pestka, and G.J. Veeramuthu, Journal of Food Service, vol. 61, No. 1, 1996, 209-212.*

Methods for Detecting Processing Temperatures of Previously Cooked Meat and Poultry Products—A Review, W.E. Townsend and L.C. Blankenship, USDA-ARS, Poultry

Meat Quality and Safety Research Unit, Richard B. Russell Agricultural Research Center, P.O. Box 5677, Athens, GA, Journal of Food Protection, vol. 52, No. 2, pp. 128-135, Feb. 1989).*

Monoclonal Antibody Detection of Porcine Meat, P. Morales, T. Garcia, I. Gonzalez, R. Martin, B. Sanz, and P.E. Hernandez, Journal of Food Protection, vol. 57, No. 2, pp. 146-149, Feb. 1994).*

Detection of Beef, Sheep, Deer, and Horse Meat in Cooked Meat Products by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Connie D. Andrews, Ronald G. Berger, Richard P. Mageau, Bernard Schwab, and Ralph W. Johnston, U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Microbiology Division, Beltsville, MD, Andrews et a., Journal of AOAC International vol. 75, No. 3, 1992.*

Lactate Dehydrogenase Monoclonal Antibody Immunoassay for Detection of Turkey Meat in Beef and Pork, Cheng-Hsin Wang and Denise M. Smith, vol. 60, No. 2, 1995, Journal of Food Science, 253-256.*

Production of a Horse-Specific Monoclonal Antibody and Detection of Horse Meat in Raw Meat Mixtures by an Indirect ELISA, Teresa Garcia, Rosario Martin, Paloma Morales, Ana I. Haza, Gonzalo Anguita, Isabel Gonzalez, Bernabe Sanz and Pablo E. Hernandez, J. Sci Food Agric 1994, 66 411-415.*

Monoconal Antibody Sandwich ELISA for the Potential Detection of Chicken Meat in Mixtures of Raw Beef and Pork, Rosario Martin, R. John Wardale, Sheila J. Jones, Pablo E. Hernandez & Ronald L.S. Patterson, Meat Sciences 30, (1991) 23-31.*

Lactate Dehydrogenase Polyclonal Antibody Sandwich ELISA for Determination of Endpoint Heating Temperatures of Ground Beef, Cheng-Hsin Wang, Mohamed M. Abouzied, James J. Pestka and Denise M. Smith, Department of Food Science and Human Nutrition, Michigan State University, East Lansing, Michigan, Journal of Food Protection, vol. 59, No. 1 pp. 51-55.*

Detection of Species Adulteration in Pork Products Using Agar-Gel Immunodiffusion and Enzyme-Linked Immunosobent Assay, Yun-Hwa P. Hsieh, Martha, A. Johnson, Carla J. Wetzstein, and Nancy Green, Journal of Food Quality 19 (1996) 1-13.*

Detection of Beef, Sheep, Deer, and Horse Meat in Cooked Meat Products by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Connie Andrews, Ronald G. Berger, Richard P. Mageau, Bernard Schwab, and Ralph W. Johnston, U.S. Department of Agricultutre, Food Safety and Inspection service, Microbiology Division, Beltsville, MD, Journal of AOAC International, vol. 75, No. 3, 1992, 572-576.*

(List continued on next page.)

Primary Examiner—Laurie Scheiner(74) *Attorney, Agent, or Firm*—Alston & Bird, LLP

(57)

ABSTRACT

Monoclonal antibodies are provided which bind to heat-treated proteins of meats. The antibodies are useful in detecting the presence of an exogenous meat in a cooked or raw meat sample. Furthermore, the antibodies can be used to determine the end point temperature of a meat sample.

OTHER PUBLICATIONS

Detection of Species Substitution in Raw and Cooked Meats Using Immunoassays, Yun-Hwa, P. Hsieh, Betsy B. Woodward and Shioy-Huey-Ho, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Food Safety, Food and Residue Laboratory, Tallahassee, Florida, Journal of Food Protection, vol. 58, No. 5, pp. 555–559.*

Detection of Poultry and Pork in Cooked and Canned Meat Foods by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, Ronald G. Berger, Richard P. Mageau, Bernard Schwab and Ralph W. Johnston, U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Microbiology Division, Medical Microbiology Branch, Beltsville, MD J. Assoc. Off. Anal. Chem. (vol. 71, No. 2, 1988).*

Proteins as Potential Endpoint Temperatures Indicators for Ground Beef Patties, S.F. Wang, M.M. Abouzied, and D.M. Smith, Journal of Food Science, vol. 61, No. 1, 1996, 5–8.* Andrews C D Et Al: "Detection of Beef, Sheep, Deer, and Horse Meat in Cooked Meat Products by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" IEEE Workshop on FPGAS for Custom Computing Machines Apr. 5–7 1993, NAPA, CA, US, vol. 75, No. 3, May 1, 1992, pp. 572–576, XPOOO490176 see the whole document.*

Patterson R. & Jones S.J.: "Review of Current Techniques for the Verification of the Species Origin of Meat" 4 The Analyst, vol. 115,—May 1990, pp. 501–506, XP002050322, see the whole document, esp. p. 504–505.*

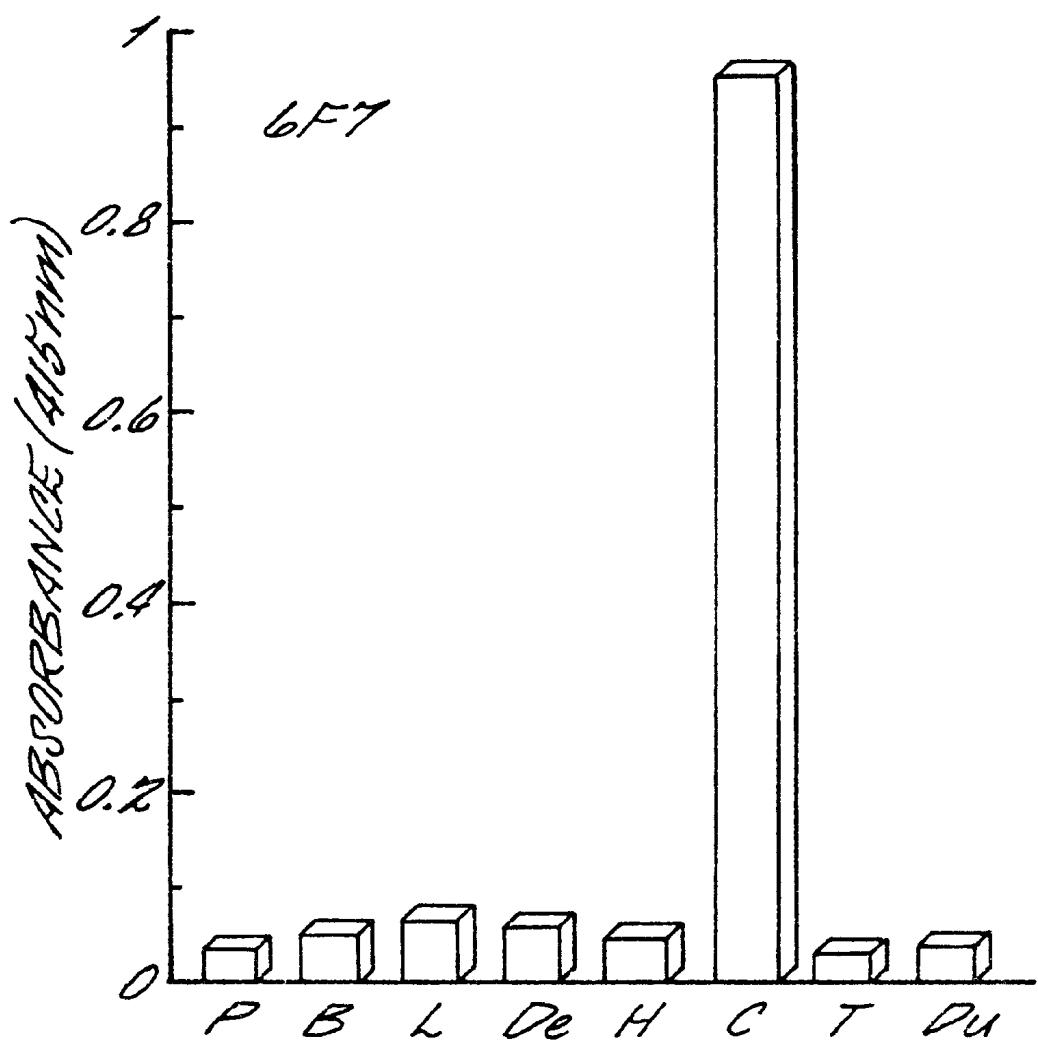
Billett E.E. Et Al., : "The Use of a Poultry-Specific Murine Monoclonal Antibody Directed to the Insoluble Muscle Protein Desmin in Meat Specification" J. Sci. Food Agric., vol. 70, —1996, pp. 396–404, XP002050323 Cited in the Application, see whole document, esp. discussion last two paragraph.*

Martin R. Et Al.; "Monoclonal Antibody Sandwich ELISA for the Potential Detection of Chicken Meat in Mixtures of Raw Beef and Pork", Meat Science, vol. 30, —1991, pp. 23–31, XP002050324, cited in the application, see the whole document.*

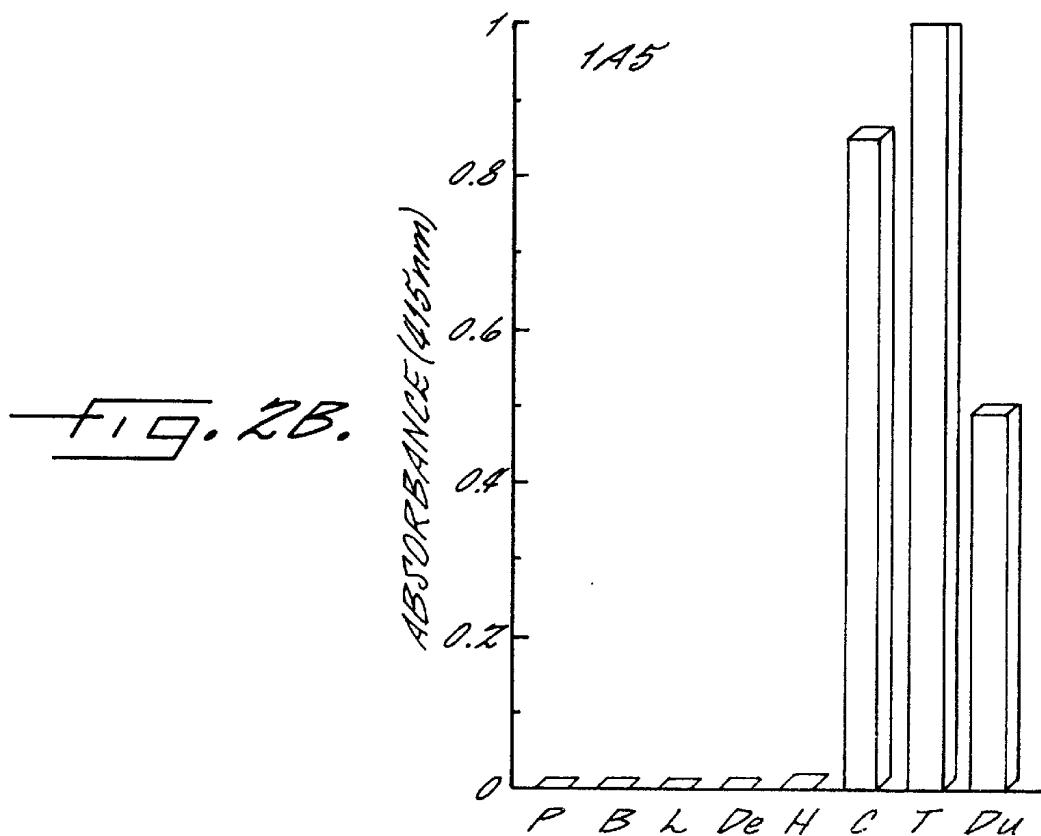
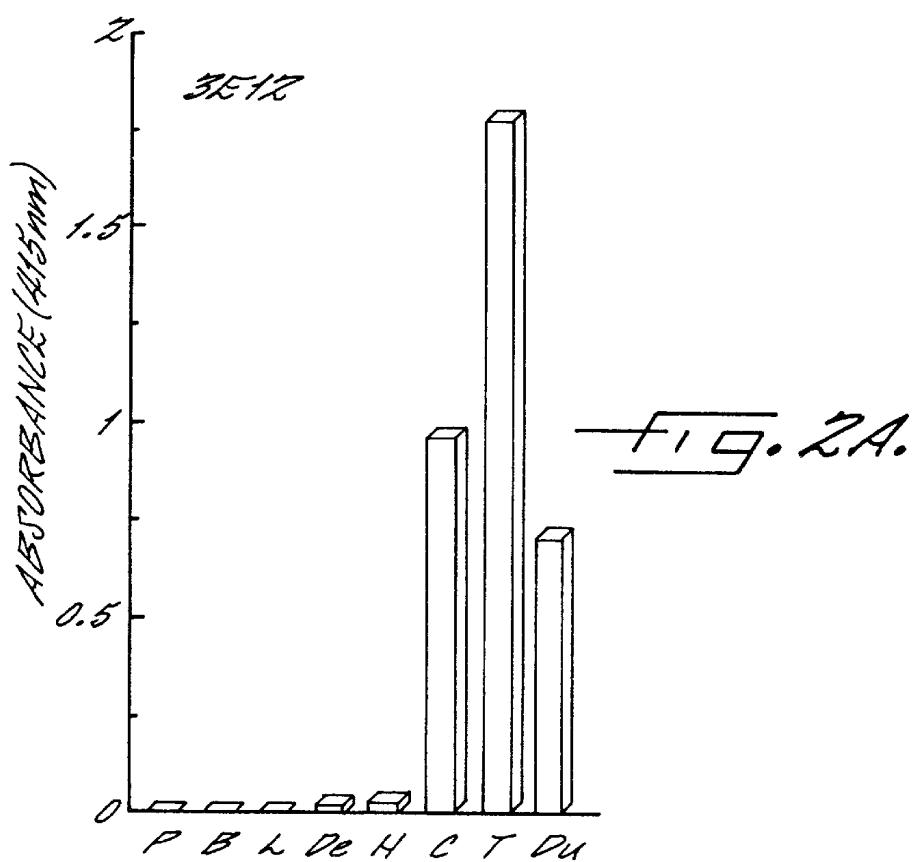
Berger R. G. Et Al.,: "Detection of Poultry and Pork in Cooked and Canned Meat Foods by Enzyme-Liked Immunosorbent Assays", J. Assoc. Off Anal. Chem., vol. 71, No. 2, —1998, pp. 406–409, XP002050326, see esp. discussion.*

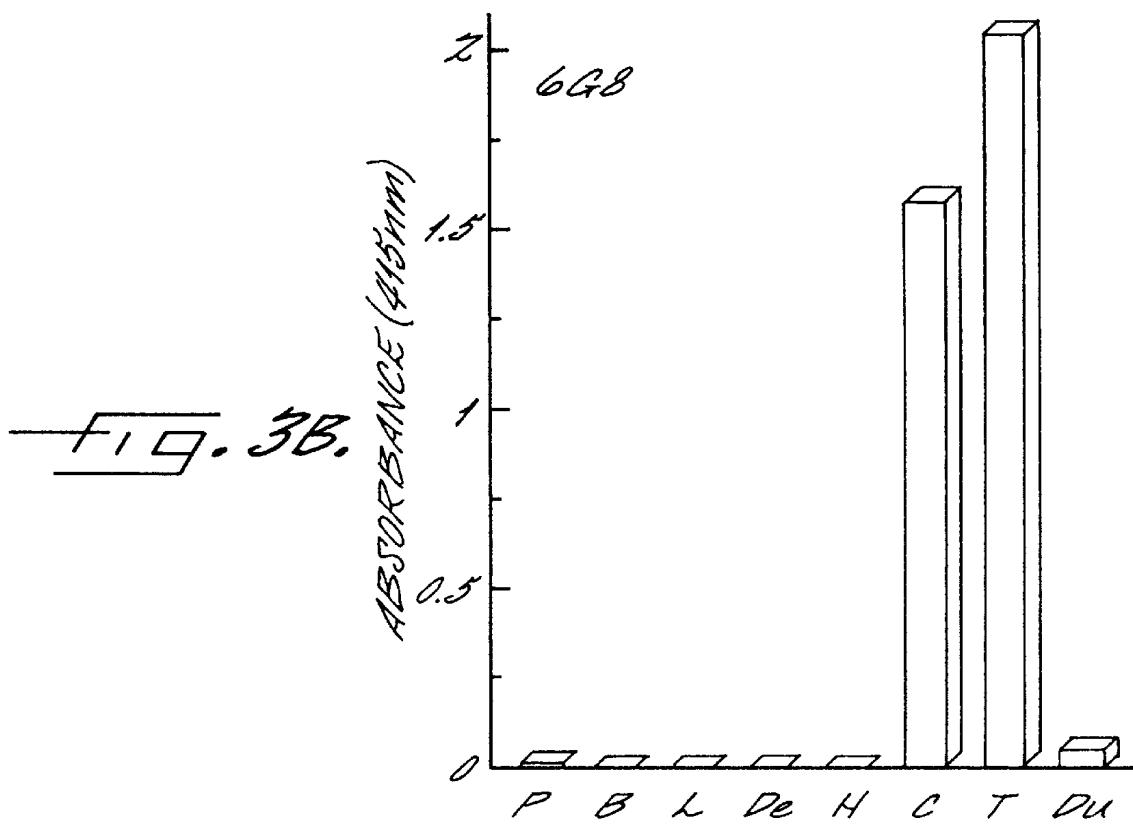
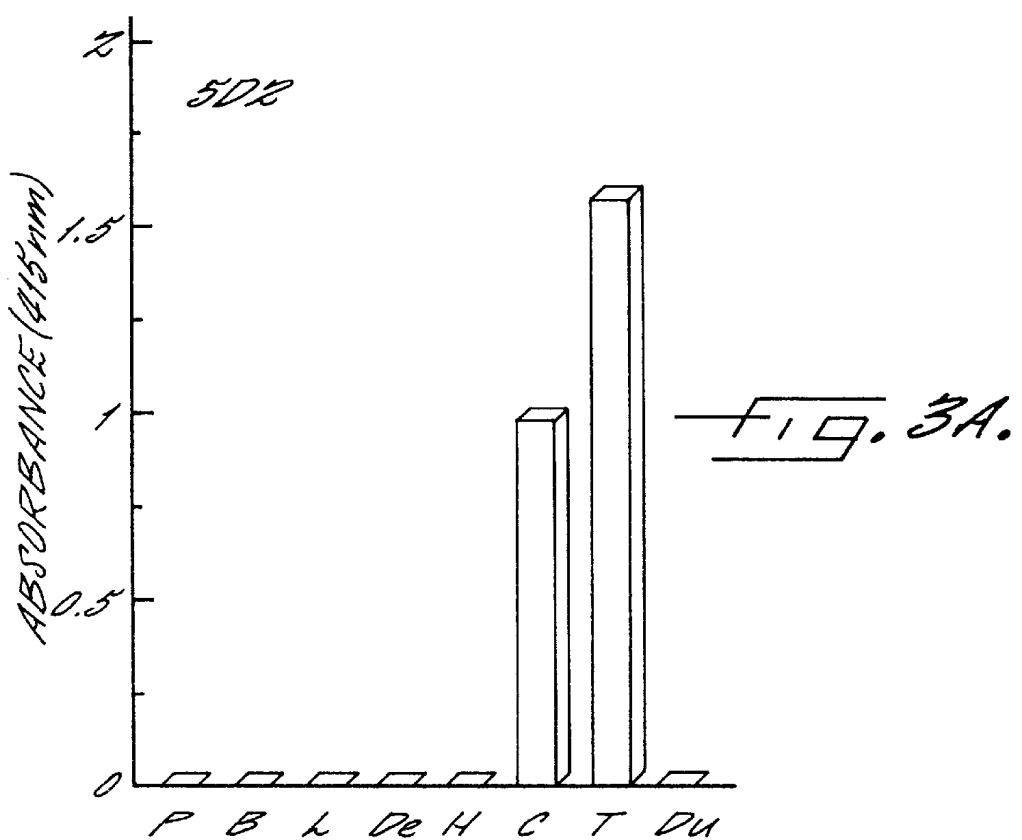
Jones S.J. & Patterson R.L. S.: "Double-Antibody ELISA for Detection of Trace Amounts of Pig Meat in Raw Meat Mixtures" Meat Science, vol. 15, —1985, pp. 1–13, XP002050325, cited in the application, see the whole document.*

* cited by examiner

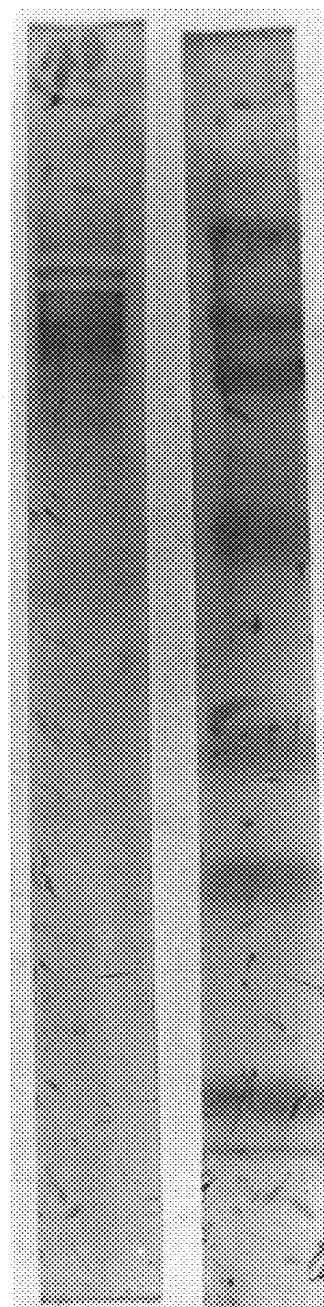


—fig. 1.





1 2

**FIG.4**

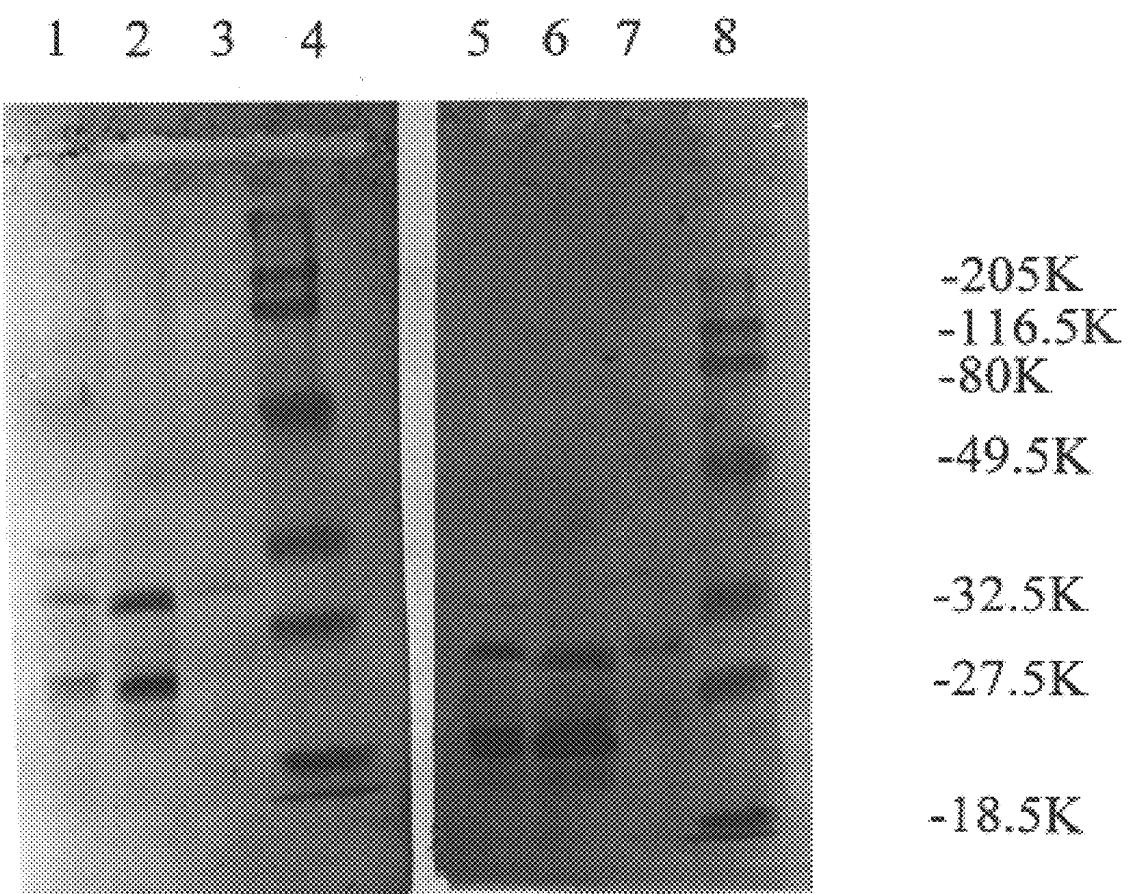


FIG. 5

1 2 3 4 5

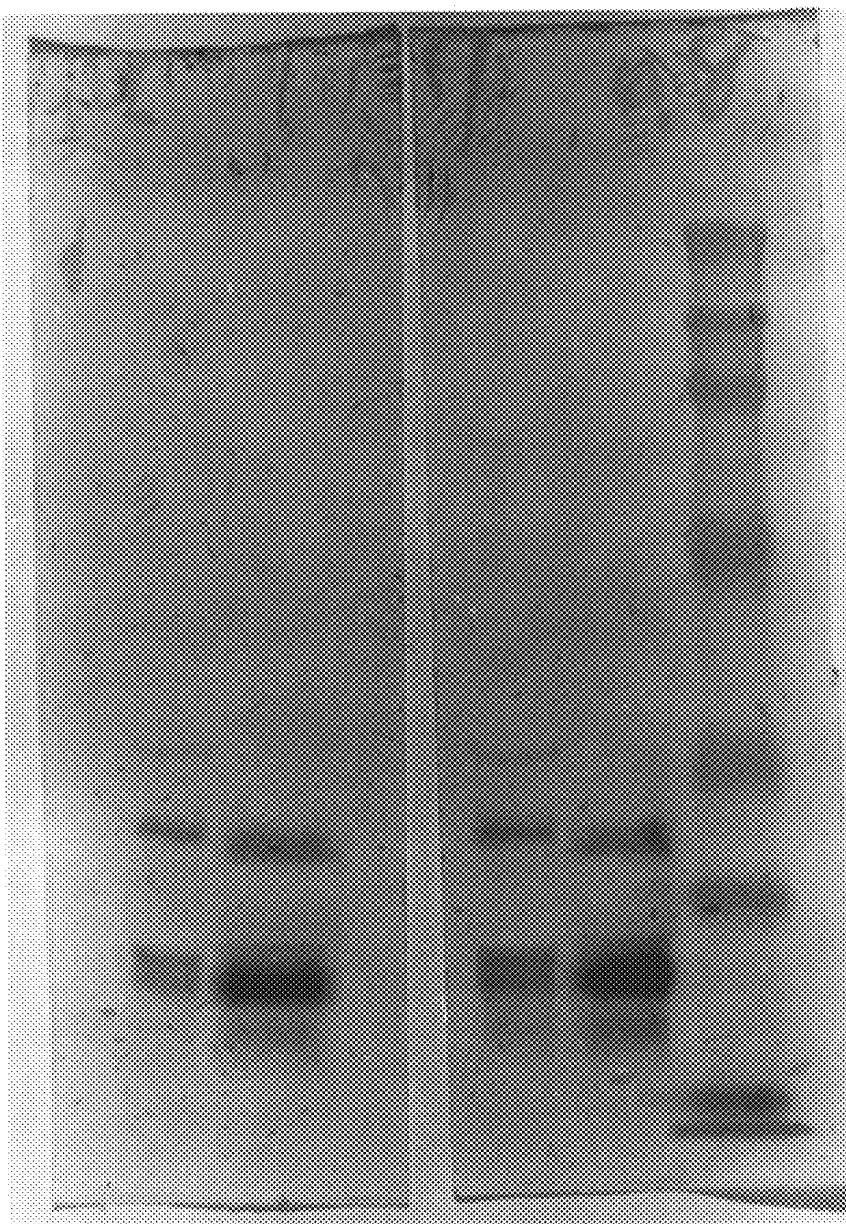


FIG. 6

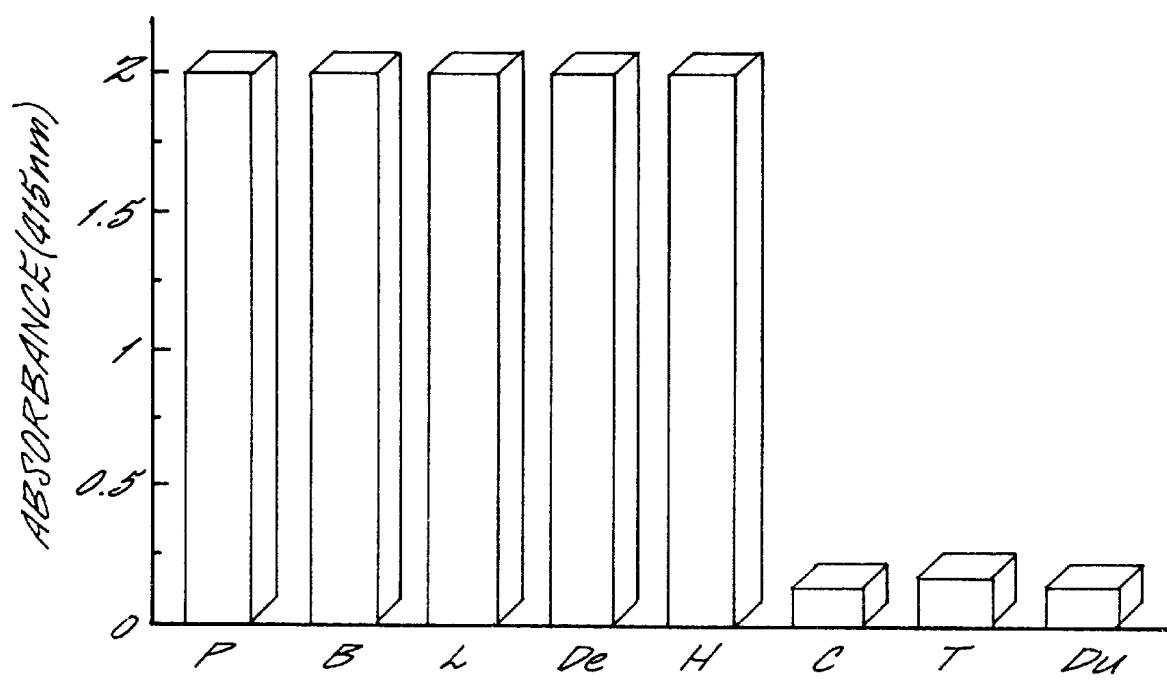


FIG. 7.

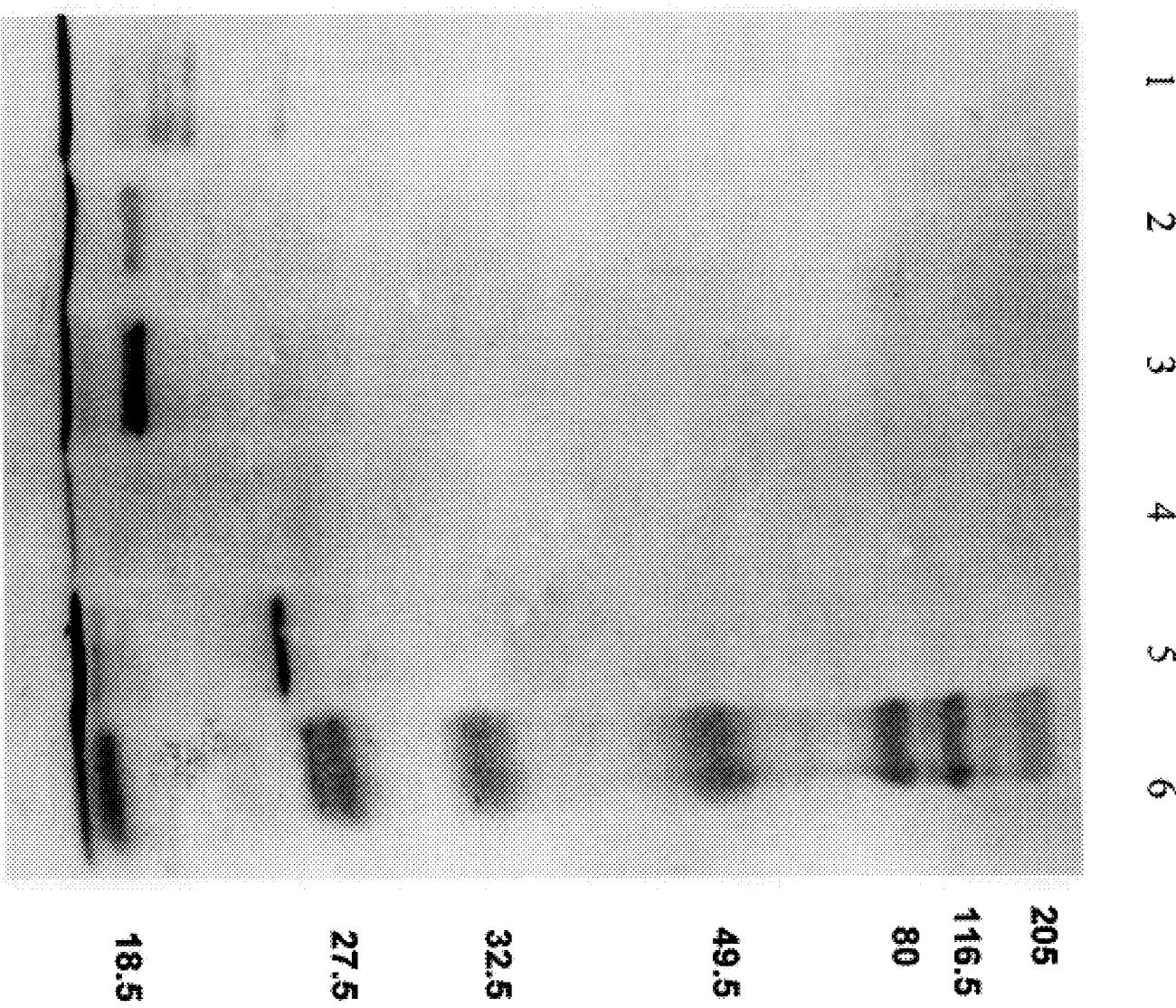


FIG. 8

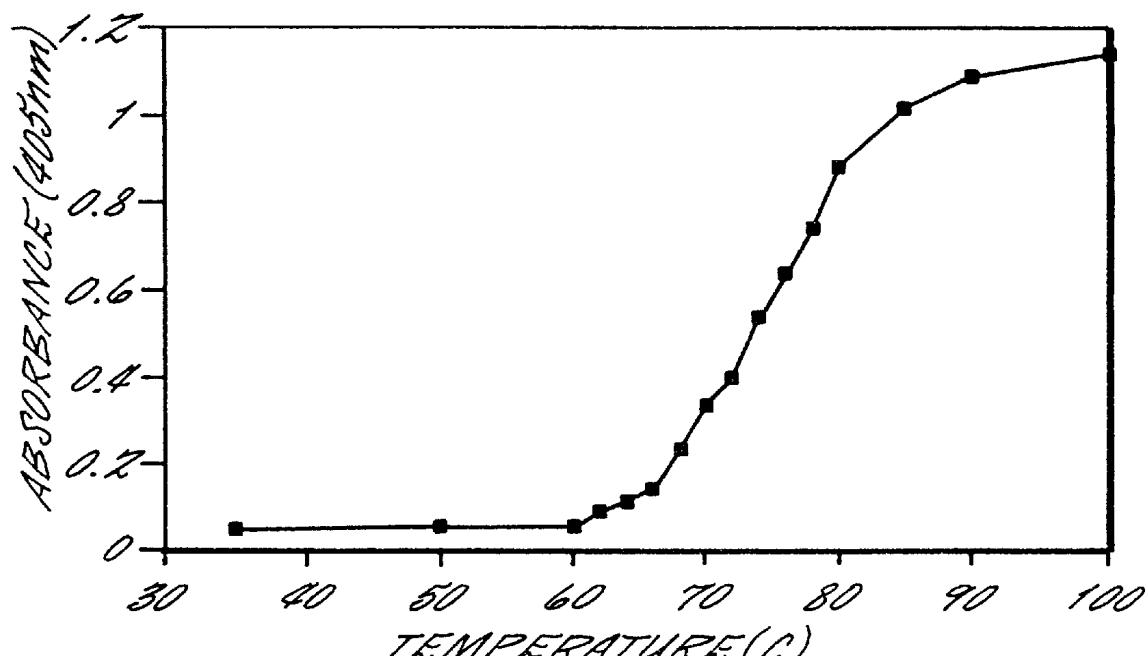


FIG. 9.

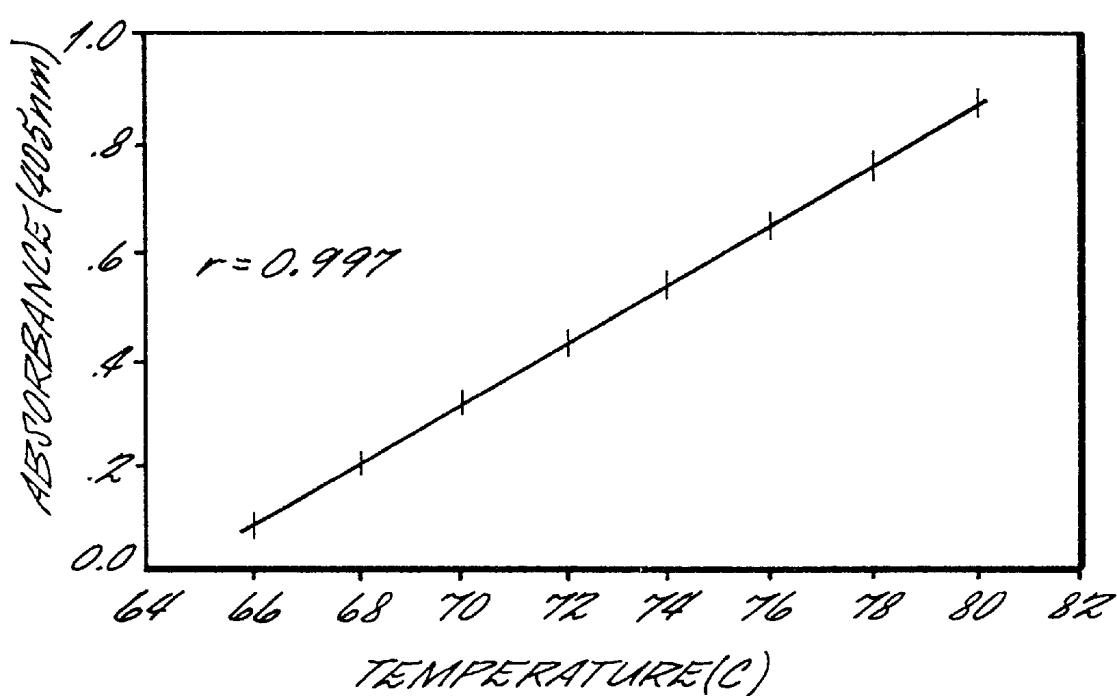


FIG. 10.

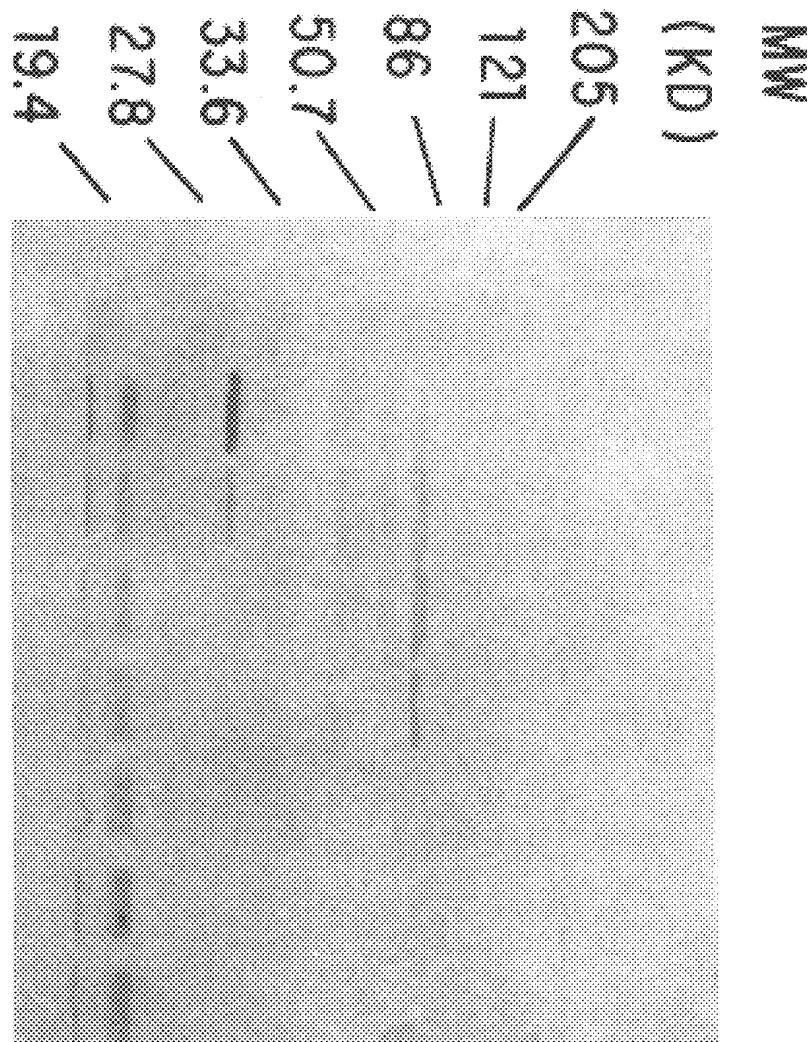


FIG. 11

SPECIFICITY OF MAb 5H9
ELISA RESPONSES OF DIFFERENT MEAT SPECIES

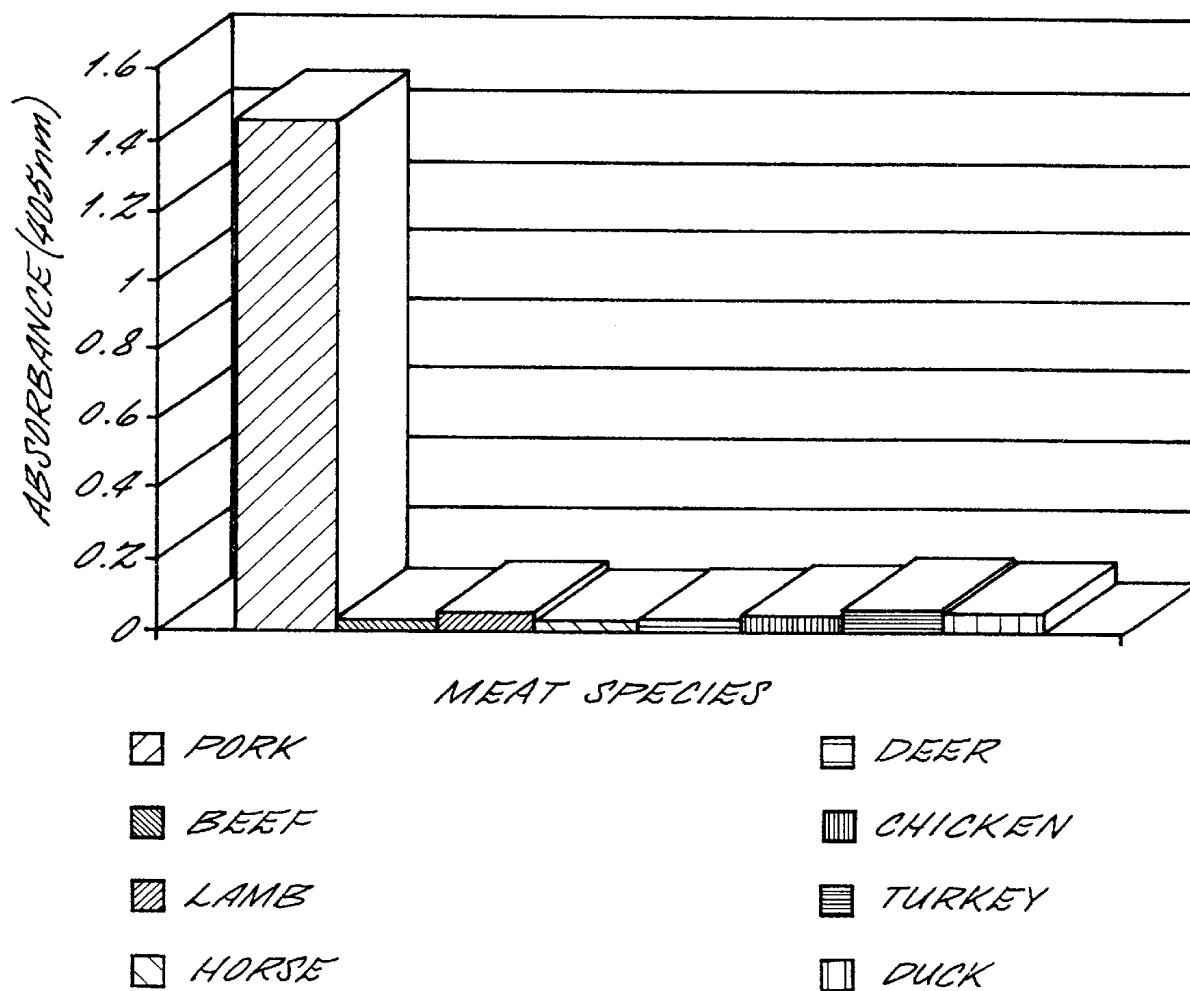
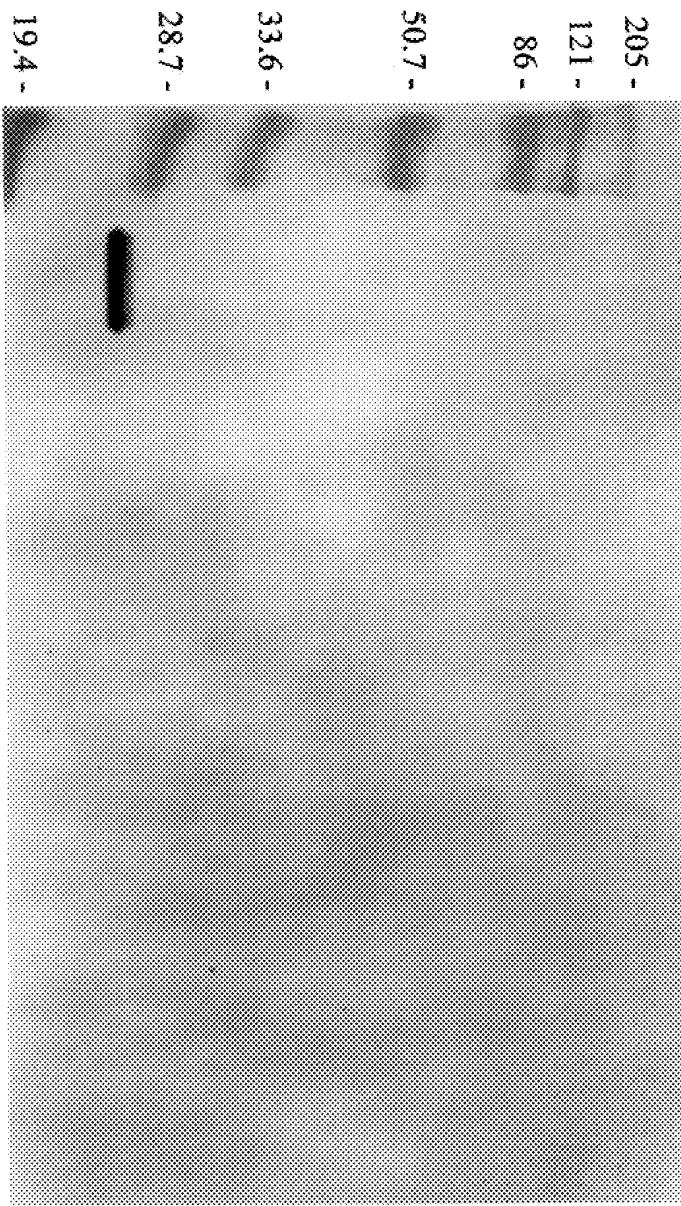
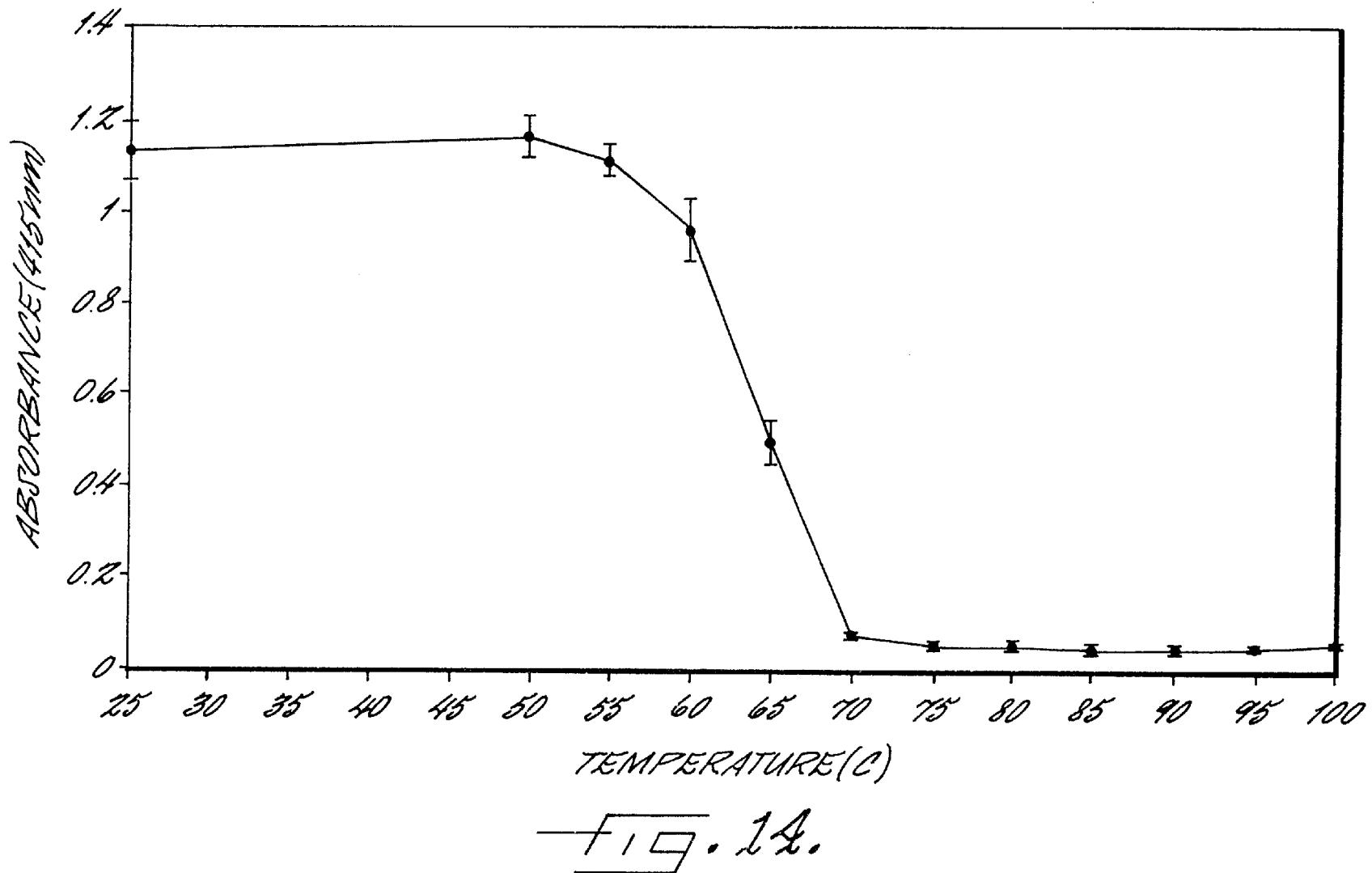


FIG. 12.



STD P B L H D C T Du

FIG. 13



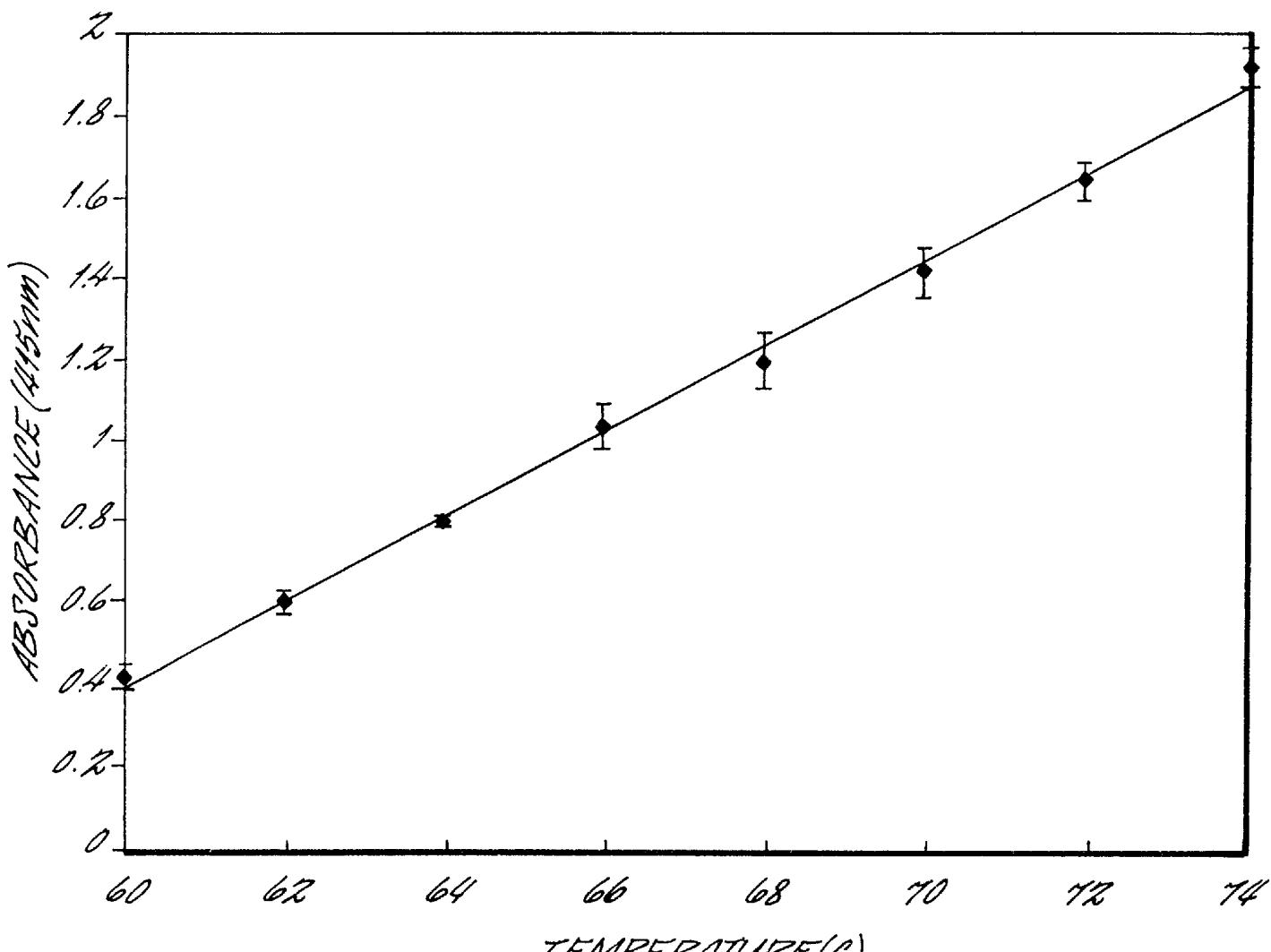


fig. 15.

MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO COOKED MEATS

RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of United States Provisional Application No. 60/024,887, filed Aug. 30, 1996, and entitled "MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO COOKED MEATS".

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to the development of monoclonal antibodies for the detection of meat species, particularly cooked meats, and for the end-point temperature of heat processed meat.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The accurate labeling of meat products is mandated and monitored by the United States Department of Agriculture (USDA) as well as by state and local governments. Mixing undeclared species in meat products is illegal under Food Labeling Regulations. Apart from regulatory reasons, the prevention of adulteration of meat products with less desirable meat species is important to the consumers for economic, health, food safety and religious reasons.

Several methods have been developed to identify meat species including electrophoresis, chromatography, DNA hybridization, and immunoassays. Immunological techniques, including agar-gel immunodiffusion (AGID) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are most commonly applied for meat species identification.

There are several disadvantages to the official method AGID. Concentrated antiserum preparations are required to obtain visible precipitin lines in AGID. Obtaining the anti-serum is expensive in large-scale testing. Furthermore, the sensitivity of AGID is variable. Usually ten percent or more contamination must be present to detect adulteration with this method. Lastly, AGID cannot be used for species identification in cooked meat because of the shortage of commercial antiserum specific to cooked meats.

The ELISA method has emerged as a sensitive, rapid, and specific method for meat speciation. This method can detect levels as low as one percent or less of meat contamination. Furthermore, it requires only simple sample preparation and no expensive equipment or highly skilled operator. In addition, the ELISA technique can be used for both qualitative and quantitative analysis of meat proteins.

Specific antibodies, either polyclonal antibodies or monoclonal antibodies (MAbs), are required as capture reagents in ELISA. Most of the ELISA methods currently employed for meat species identification use polyclonal antibodies as a capture reagent. However, polyclonal antibodies have disadvantages such as limited production, variable affinity and a requirement for further purification to eliminate cross-reaction.

Using monoclonal antibody based ELISA can provide better data quality and eventually reduce the cost of assays. To date, the monoclonal antibodies which are utilized in ELISA based assays for meat identification have been raised against native proteins. The antibodies are useful for the detection of meat in raw meat mixtures.

A few disclosures of the production of polyclonal antibodies for the qualitative detection of meat species in cooked meat samples has been reported. These polyclonal antibodies have been raised against native heat-resistant immunizing antigens.

Wide spread meat species adulteration has been found particularly among heat-processed meat products and retail meat markets. Hsieh et al. (1995) *Jrnl. of Food Quality* 19:1-13, indicated that the violation rate in cooked products

5 was higher than raw meats (22.9% versus 15.9%) in the domestic market. This adulteration can have serious health consequences. Poultry carries pathogens that cause food-borne diseases. Cooking poultry requires a minimum internal temperature of 71.1° C. (160° F.) to kill salmonella. Beef requires a minimum internal temperature of 68.3° C. (155° F.) to kill *E. Coli* H7:0157. If a meat product like beef is contaminated with poultry meat, it might impose a potential health hazard due to the inadequate heat-processing even at a very low level of contamination.

10 Development of a suitable screening method to detect undeclared exogenous meat is important to comply with the food labeling regulation. Furthermore, a means for determining the adequate end-point cooking temperature for food safety is also important.

15 There is, therefore, needed a method for the determination of species identification in cooked meats as well as to determine the end-point cooking temperature of meats.

SUMMARY OF THE INVENTION

20 The present invention is drawn to antibodies, monoclonal antibodies or fragments thereof which bind to soluble heat-denatured, heat degraded meat proteins, or thermal-stable muscle protein as well as to methods for making such antibodies and their uses. The antibodies are capable of meat species identification in raw and cooked meats and thus, find use in the detection of species substitution in meats. Additionally, the monoclonal antibodies that react to heat-denatured proteins are useful as an indicator of end-point temperature for cooked meats. Kits containing the antibodies are also provided.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 The specificity of MAb 6F7 to cooked meat determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings. P: pork; B: beef; L: lamb, De: deer; H: horse; C: chicken; T: turkey, Du: duck.

FIG. 2 The specificity of MAbs 3E12 and 1A5 to cooked meat determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings. P: pork; B: beef; L: lamb, De: deer; H: horse; C: chicken; T: turkey, Du: duck.

FIG. 3 The specificity of MAbs 5D2 and 6G8 to cooked meat determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings. P: pork; B: beef; L: lamb, De: deer; H: horse; C: chicken; T: turkey, Du: duck.

FIG. 4 Immunoblots of proteins extracted from cooked chicken separated on 12% (w/v) SDS-PAGE. Lanes; 1=reacted with 6F7, 2=prestained molecular weight standard.

FIG. 5 Immunoblots of proteins extracted from cooked chicken, turkey and duck separated on 12% (w/v) SDS-PAGE. Lanes; 1 and 5=chicken, 2 and 6=turkey, 3 and 7=duck, 4 and 8=molecular weight standard. Lanes 1 to 4 were reacted with MAb 3E12. Lane 5 to 8 were reacted with MAb 1A5.

FIG. 6 Immunoblots of proteins extracted from cooked chicken and turkey separated on 12% (w/v) SDS-PAGE. Lanes; 1 and 3=chicken, 2 and 4=turkey, 5=molecular weight standard. Lanes 1 and 2 were reacted with MAb 5D2. Lane 3 and 4 were reacted with MAb 6G8.

FIG. 7 The specificity of MAb 2F8 to cooked meat determined by indirect ELISA. Data shown are the means of

three readings. P: pork; B: beef; L: lamb; De: deer; H: horse; C: chicken; T: turkey; Du: duck.

FIG. 8 Immunoblots of proteins extracted from five cooked mammalian meats separated on 12% (w/v) SDS-PAGE reacted with MAb 2F8. Lanes: 1=pork, 2=beef, 3=lamb, 4=deer, 5=horse, 6=Molecular weight standard.

FIG. 9 Indirect ELISA responses of MAb 2F8 to protein extracts from beef cooked to different end point temperature (EPT). (Values are the mean of eight replications).

FIG. 10 Linear regression of indirect ELISA response and EPT of cooked beef using MAb 2F8. (Correlation coefficient was determined by eight replicate values).

FIG. 11 Western blot of muscle extracts from beef cooked to different EPT. MAb 2F8 was used as probing agent.

FIG. 12 The specificity of MAb 5H9 determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings.

FIG. 13 A representative SDS-PAGE and Western blot showing the antigenic components in raw and cooked pork using MAb 5H9.

FIG. 14 Indirect competitive ELISA response of MAb 5D2 to protein extract from chicken breast cooked to different end-point temperature (EPT).

FIG. 15 Indirect ELISA response of MAb 5D2 to protein extract from chicken breast cooked to different end-point temperature (EPT).

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

Antibodies and monoclonal antibodies, including fragments thereof which are capable of binding with the specificity of the antibody or monoclonal antibody, to soluble heat-denatured or heat degraded meat proteins are provided. Additionally, antibodies and monoclonal antibodies to thermal-stable muscle protein are provided. Such antibodies specifically bind to soluble heat-denatured or heat degraded proteins as well as to thermal-stable muscle proteins from meat and are capable of identifying particular meat types or meat species.

The antibodies of the invention include polyclonal and monoclonal antibodies as well as fragments thereof which retain the ability to bind to the heat-treated proteins from meat. Heat-treated proteins include heat degraded, heat-denatured soluble proteins as well as to thermal-stable muscle proteins from meat. An antibody, monoclonal antibody, or fragment thereof is said to be capable of binding to a molecule if it is capable of specifically reacting with the molecule to thereby bind the molecule to the antibody, monoclonal antibody, or fragment thereof. The term "antibody" (Ab) or "monoclonal antibody" (MAb) is meant to include intact molecules as well as fragments or binding regions or domains thereof (such as, for example, Fab and F(ab)₂ fragments) which are capable of binding antigen. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage, such as papain or pepsin. Alternatively, antigen-binding fragments can be produced through the application of recombinant DNA technology or through synthetic chemistry.

Methods for the preparation of the antibodies of the present invention are generally known in the art. For example, see *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed. Harlow & David Lane (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988), as well as the references cited therein. Standard reference works setting forth the general principles of immunology include: Klein, J. *Immunology: The Science of Cell-Noncell Discrimination*, John Wiley & Sons, N.Y. (1982);

Dennett, R. et al. *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension In Biological Analyses* Plenum Press, N.Y. (1980); and Campbell, A. "Monoclonal Antibody Technology," *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology*, Vol. 13, Burdon et al. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1984). See also, U.S. Pat. Nos: 4,609,893; 4,713,325; 4,714,681; 4,716,111; 4,716,117; and 4,720,459.

The antibody and monoclonal antibodies of the present invention can be prepared by various methods. One method to obtain antibodies to heat-degraded or heat-denatured proteins utilizes heat-treated (100° C., 15 min.) soluble meat proteins as antigen. Such soluble proteins can be prepared by blending a sample of meat from a species of interest, adding a solution, generally saline to the blended meat, followed by heating, e.g. boiling, the homogenate. The soluble proteins are then extracted by gentle agitation followed by centrifugation and filtration. The supernatant contains the protein extract which can be used to immunize mice.

Another antibody preparation method utilizes thermal-stable muscle protein as antigen. Such thermal-stable proteins can be prepared by modifying the method of Milgrom and Witebsky (1962), *Immunology* 5:46-66, herein incorporated by reference. Generally, after removing fat and connective tissue, muscle tissue is homogenized, sonicated and heated to boiling. The mixture is centrifuged; the supernatant collected, autoclaved, and filtered to remove debris and proteins precipitated by using, for example, ethanol. The precipitate is dried and can be used to immunize an animal, i.e., mice, for the production of antibodies.

A critical aspect of the invention involves the selection of antibodies or monoclonal antibodies made by the above method by indirect ELISA. In performing the indirect ELISA assays, the soluble protein antigen is bound to a polyvinyl surface. The polyvinyl surface is capable of binding the heat-treated soluble meat (denatured or degraded) proteins better than other materials tested, such as polyethylene plates. Until the present invention, this had not been recognized in the prior art resulting in false negative readings for antibody production.

By the method of the invention described herein, monoclonal antibodies having a desired specificity can be selected. Thus, monoclonal antibodies specific for a particular meat species or for a type or class of meats can be produced.

By meat type or class is intended a broader class of meats including several meat species. Thus, type or class refers to mammalian, poultry, and the like. By meat or meat species is generally intended meats which are commonly used for consumption, including poultry such as chicken, turkey, and duck, and mammalian meats, such as pork, beef, lamb, deer, and horse. Thus, particular meat species include but are not limited to chicken, turkey, duck, pork, beef, lamb, deer, horse, and the like. It is recognized that the method of the invention could be utilized to obtain antibodies against any meat species.

The methods of the invention can be used to develop antibodies which are capable of identifying classes of meats, for example, mammalian verses poultry, as well as to identify the particular meat species. In this manner, the antibodies of the invention are useful for meat type or class as well as particular meat species identification.

Two broad types or classes of antibodies or monoclonal antibodies may be prepared by the methods described above. One type encompasses antibodies which bind thermal-stable proteins. Such antibodies are capable of binding to both cooked and raw meat samples. Thus, these antibodies are useful for identification of meats in both raw and cooked meat samples.

5

The second type of antibodies and monoclonal antibodies of the invention are capable of binding cooked meat samples. However, it is recognized that for species identification, both raw and cooked meats can be utilized in the invention. Where the sample of the meat is raw, a heat denaturing step will be needed. Accordingly, the sample can be heated, i.e., boiled, prior to contacting the sample with the antibody.

Because the antibodies are both meat and class specific, they are useful in the detection of species substitution in meats. To facilitate their use, kits containing the antibodies can be made. The antibodies can be coated onto a solid phase, such as ELISA microliter plate, dipstick, magnetic beads, and the like, and used as a sensitive reagent to accurately detect a meat of interest in both cooked and raw meat products. This commercial kit form is useful for rapid and convenient use by regulatory agencies and the meat industry. By "kit" is intended that the monoclonal antibody and any necessary reagents are contained in close confinement in the form of a ready-to-use test kit. The antibodies of the invention are useful in non-competitive ELISA, including double-sandwich ELISA assays as well as competitive assays. However, other formats such as homogenous enzyme immunoassays may be developed.

The second type of antibodies or monoclonal antibodies of the invention also find use as indicators of end-point temperature of a cooked meat sample. Inadequate cooking is an important contributing factor in foodborne disease outbreaks caused by meat products. The second type of antibodies are developed against heat-denatured or heat degraded soluble proteins. Heat induces conformational changes of the protein molecules. In this manner, end-point temperature can be determined by using the antibody in an ELISA to detect the immunoreactivity changes of the heat treated muscle proteins. An increase in reactivity is noted due to increased heating process of the meat sample. The antibody allows for a means to determine end-point temperature to which beef and poultry have been processed.

Preferred embodiments of the invention include the following monoclonal antibodies which have been developed using heat-denatured or heat degraded proteins as antigens.

The monoclonal antibody 2F8, produced by hybridoma cell line 2F8 deposited as ATCC No. HB-12155, reacts with five commonly used mammalian cooked meats, pork, beef, lamb, horse and deer. The monoclonal antibody can be used as a capture reagent in ELISA to detect any of the five mammalian meats in a sample. The monoclonal antibody is particularly useful to identify meat adulteration of any of the five mammalian meats in a poultry product. It also finds use in determining the end-point cooking temperature for mammalian meats.

In another preferred embodiment, five monoclonal antibodies specific to cooked chicken muscle soluble proteins have been developed. These monoclonal antibodies represent three groups of cell lines which secrete monoclonal antibodies to specifically react with heat denatured poultry meats. The first group of monoclonal antibodies are represented by the monoclonal antibody 3E12, produced by hybridoma cell line 3E12, deposited as ATCC No. HB-12154, are capable of distinguishing between cooked poultry meats (chicken, turkey and duck) and cooked land animal meats (pork, beef, lamb, deer and horse).

The second group of monoclonal antibodies represented by 6F7, produced by hybridoma cell line 6F7, react with cooked chicken without any cross-reaction to any other species tested. They are useful to distinguish chicken tissue from other non-chicken meats.

6

The third group of monoclonal antibodies represented by 5D2, produced by hybridoma cell line 5D2 deposited as ATCC No. HB-12156, react with both cooked chicken and turkey but not with other meat species.

All three classes of monoclonal antibodies react with cooked poultry proteins. However, the monoclonal antibodies can be used in testing raw meats as well as cooked meat products. For the analysis of raw meats, an additional heat treatment is required for sample preparation. The monoclonal antibodies can be used as a capture reagent in ELISA to detect poultry meats in a sample. They also find use in determining the adequate end-point cooking temperature for poultry meats.

The antigens for preparation of the above specifically listed antibodies are soluble heat-denatured or degraded protein or peptide units. Most of them are low molecular weight proteins/peptides having a molecular weight in the range of up to about 35 kd. In the heating process, some muscle proteins are degraded into smaller units, most are denatured and many become insoluble. See, generally Tajima et al. (1991) *J. Home Econ. Jpn.* 42:967-971. The extract which is used as an immunogen is a crude soluble protein extract which has been heat treated. The use of the crude extract increases the number of species-specific antibodies which are produced. Particular antibodies can be selected based on binding characteristics.

Another preferred embodiment of the invention includes monoclonal antibodies prepared using thermal-stable muscle soluble proteins as antigens. The monoclonal antibody 5H9, produced by hybridoma cell line 5H9 deposited as ATCC No. HB-12245, reacts specifically with raw and cooked pork. No significant cross-reactivity is found among other meats including beef, lamb, horse, deer, chicken, turkey, and duck. Antibody 5H9 is useful for detecting pork in a heterogeneous meat sample.

The MAb 5H9 recognizes three protein bands with apparent molecular weights about 24, about 22 and about 20.5 kd in raw pork but recognizes one protein band of about 24 kd in cooked pork. The 24 kd protein was identified as a species specific thermo stable muscle protein.

The following experiments are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXPERIMENTAL

EXAMPLE 1

MATERIALS AND METHODS

Extraction of Cooked Meat Soluble Proteins

Lamb, turkey and duck meat were purchased from a local supermarket. Pork, beef and chicken meat were obtained from the Auburn University Meats Laboratory. Horse and deer meats were obtained from the College of Veterinary Medicine, Auburn University.

Extraction of soluble proteins was performed as follows. Thirty grams of meat from each species were cut into small pieces and blended separately by blender (Virtis Model 45, Gardiner, N.Y.) for one minute. Three fold (w/v) of saline solution (0.85% NaCl) was added to the blended meat. The homogenate was cooked by boiling at 100° C. for fifteen minutes. The soluble proteins were extracted by gentle agitation for two hours at 4° C. then centrifuged at 14,300×g for thirty minutes at 4° C. (Beckman J-21C, Palo Alto, Calif.). Supernatants were filtered through Whatman No. 1 filter paper (Maidstone, Kent, England) and stored at -80° C. until use.

The protein concentration of extracts was determined by protein assay kit II(Bio-Rad, Hercules, Calif.) based on the

method of Bradford (1976). Bovine serum albumin was used as standard in this assay.

Immunization

Four ten-week-old female BALB/c mice (PRN 9612-R-0597) were immunized with the crude protein extract of cooked chicken. Mice were injected intraperitoneally or subcutaneously with an emulsion containing 100 μ l of antigen (0.5 μ g/ μ l of cooked chicken protein) and 100 μ l of complete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, Mo.). Three weeks later, mice were boosted with the same dose of antigen emulsified in incomplete Freund's adjuvant (Sigma). One week after, sera were collected from mice by tail vein bleeding. The sera were used to test the antibody titers against antigen using indirect ELISA. A final booster was done four days before fusion by injecting 200 μ l of 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 containing 50 μ g of cooked chicken antigen into the mouse which had the highest antibody titer.

Production of Monoclonal Antibodies

Peritoneal macrophages were collected as feeder cells one day before fusion. Four days after the final booster, the injected mouse was sacrificed, and the spleen was harvested. Cells were washed from spleen by wash media (RPMI-1640 serum free medium supplemented with 1% oxaloacetate, pyruvate, and insulin (OPI) containing 10% glutamine, and 10% penicillin and streptomycin (pfs)(Sigma). Cells of the murine myeloma cell line, P3X63, Ag8.653, ATCC CRL 1580 were retrieved from liquid nitrogen and cultured in large tissue culture plates (Corning, Corning, N.Y.). The culture procedure is described in Procedure A (page 31). The spleen cells were fused with myeloma cell line Ag8.653 in a 2:1 ratio using 50% polyethylene glycol (PEG) 4000 (Sigma) as the fusion agent. One ml of 50% PEG was gently added to the cells dropwise. After standing for one minute, 30 ml of wash media was added to cells dropwise. The fused cells were resuspended in Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) selective growth medium (RPMI-1 640 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 1% OPI, 1% glutamine, 1% p/s, 1% HAT) (Sigma) and seeded in 96-well tissue culture plates that have been set with mouse thymocyte feeder cells (Kohler and Milstein, 1975). The hybridoma cells were incubated at 37° C. with 5% CO₂ (Napco CO₂ incubator model 6300, Tualatin, Oreg.).

The supernatants of hybridoma cells were screened by indirect ELISA against cooked chicken antigen. Hybridoma cells from the positive wells were expanded to 48-well plates and collected supernatants to test against protein extracts from cooked pork, beef, lamb, deer, horse, chicken, turkey and duck for cross-reactivity.

Antibody-producing hybridoma cells of interest were selected and recloned twice by limiting dilution (Campbell, 1991). Cells were diluted with complete growth media (RPMI-1640 supplemented with 15% FBS, 1% OPI, 1% glutamine and 1% p/s) to give a concentration of 0.5 or 1 cell per well. Two hundred μ l of each dilution were plated in each well to 96-well plates seeded with mouse thymocyte feeder cells. The subcloned hybridoma cells were screened using the method described previously.

The antibody-producing hybridoma cells were expanded from 96-well plate to 48-well plate. When the cells grew heavily in the well, they were expanded to 24-well plate, 12-well plate, small petri culture dish and large petri culture dish, sequentially. When cells grew heavily in the large petri dish, they could be frozen and stored in liquid nitrogen (Procedure B, page 32).

ELISA

Two μ g of chicken antigen or protein extracts from the eight cooked meat species in 100 μ l of carbonate buffer (0.06

M pH 9.6) was coated to each well of a 96-well round-bottomed vinyl microtiter plate (Costar, Cambridge, Mass.) and incubated for 1 h at 37° C. or at 4° C. overnight. After washing three times with 0.01M phosphate buffered saline, pH 7.2, containing 0.5% Tween-20 (PBST) using an immunowash microplate washer (Bio-Rad model 1250), 100 μ l of 1% bovine serum albumin (Sigma) in PBS were added to each well to block nonspecific binding sites. Following incubation for 1 h at 37° C., the plate was rinsed three times with PBST, and 100 μ l of hybridoma cell supernatant were then added to each well and incubated for 1 h at 37° C., and an additional hour at room temperature. After washing the plate with PBST three times, 100 μ l of diluted (1:3000 in PBS) horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Bio-Rad) was added and the plates were incubated for 1 h at 37° C. The plate was washed with PBST three times and 100 μ l of substrate solution containing 2,2'-azino-di-[3-ethyl-bezthiazoline-6-sulfonic acid] and hydrogen peroxide (Bio-Rad) was added to each well. The plate was incubated for ten minutes at 37° C. The reaction was stopped by adding 50 μ l of 10% oxalic acid and the absorbance was read in a microplate reader (Bio-Rad model 450) at 415 nm.

Isotyping of MAb

The isotype of MAb was determined by a mouse monoclonal antibody isotyping kit according to manufacturer's manual (Sigma).

Concentrating of Protein Extracts

Protein extracts of cooked meats were concentrated by ultrafiltration (Model 8050, Amicon, Beverly, Mass.) using a YM-10 membrane (Amicon). Nitrogen was applied to the system at 2114 g/cm² to facilitate the filtration process.

SDS-PAGE and Western Blot

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to resolve the protein extracts of different cooked meat species. Western blot was then carried out to transfer proteins from gel to nitrocellulose membrane and to determine the molecular weights of immunogenic components which reacted with developed MAbs. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to the method of Laemmli (1970) with the following modifications. Proteins were separated on 4% acrylamide stacking gel (pH 6.8) and a 12% acrylamide separating gel (pH 8.8). The protein extracts of different cooked meat species were diluted one-half with sample buffer containing 2% (wt/vol) SDS, 5% (vol/vol) β -mercaptoethanol, 60 mM Tris hydrochloride (pH 6.8), 25% (vol/vol) glycerol and 0.0001% (wt/vol) bromophenol blue (Laemmli, 1970), boiled for 2 minutes, cooled, and applied to the gel at 10 μ g/well. The gel was electrophoresed at 200V for 45 minutes using a Protean-II minigel system (Bio-Rad) connected to a power supply (Bio-Rad Model 3000). After electrophoresis, the resolved protein bands were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) at 100 V for 1 hour using an electroblotting apparatus (Bio-Rad) in blotting buffer (20 mM Tris, 250 mM glycine, 20% methanol) according to the method of Towbin et al. (1979). Upon completion of the electroblotting, the nitrocellulose membrane was blocked by 3% gelatin (Bio-Rad) in PBS for 30 minutes. Following two washes in Tris-buffered saline with Tween (TBST) (TBS, pH 7.5, containing 0.05% Tween-20), the membrane was incubated with hybridoma supernatant in antibody buffer (1% gelatin in TBST) overnight at room temperature. The excess MAb was removed by washing twice with TBS, and the membrane was incubated with goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate diluted in antibody buffer (1:3000) for 1 hr at room

temperature. The membrane was washed again with TBS and developed with alkaline phosphatase substrate (Bio-Rad) for 1 hr at room temperature. The reaction was stopped by adding 100 μ l of 10% oxalic acid and the absorbance was read in a microplate reader (Bio-Rad model 450) at 415 nm.

temperature. After washing with TBST two times, and an additional wash with TBS, the membrane was incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ p-nitroblue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) in alkaline phosphatase color development solution (0.1M, pH 9.5 Tris buffer)(Bio-Rad). The reaction was stopped by washing the membrane in distilled water. The appearance of a dark purple band indicated the antibody binding site. The prestained PAGE broad range standards including myosin (M. Wt. 205,000), β -galactosidase (M. Wt. 116,500), bovine serum albumin (M. Wt. 80,000), ovaibumin (M. Wt. 49,500), carbonic anhydrase (M. Wt. 32,500), soybean trypsin inhibitor (M. Wt. 27,500), lysozyme (M. Wt. 18,500) and aprotinin (M. Wt. 6,500) were used as molecular weight markers in SDS-PAGE and Western immunoblotting.

Preparation of Adulteration Standards

The protein extracts of cooked chicken, turkey or duck were used as adulterants to cooked pork or beef. Different percentage (vol/vol) of adulterating protein extracts were mixed with pure protein extract of cooked pork. Protein concentration was calculated for each mixture according to the amount of protein in each pure protein extract. Each mixture was diluted in carbonate buffer (0.06M pH 9.6) to the protein concentration of 2 μ g/100 μ l and used as antigen in ELISA.

RESULTS AND DISCUSSION

Soluble muscle crude protein extract of cooked chicken was used as the antigen to immunize mice. Sera of all four immunized mice showed very high titers of antibodies against the antigen. Only the mouse showing the highest titer was sacrificed for fusion. Screening supernatants of hybridoma clones by indirect ELISA illustrated that a number of clones produced MAbs against cooked chicken antigen. Only the positive clones giving strong positive indirect ELISA were expanded to 48-well plates to obtain enough supernatant for testing against cross-reaction to other species (pork, beef, lamb, deer, horse, turkey and duck). One hundred and sixty-six clones were expanded and tested for cross reactivity and six were chosen for further study. When the six hybridoma cell lines were tested against cooked protein extracts of all species, MAbs secreted by cell line 6F7 were specific to chicken without noticeable cross-reactivity to pork, beef, lamb, deer, horse, turkey and duck was shown (FIG. 1). Hybridoma cell lines, 3E12 and 1A5, secreted MAbs specific to all three poultry muscle proteins (chicken, turkey and duck). There was no cross-reactivity to the five cooked mammalian meats for both MAbs (FIG. 2). Two other hybridoma cell lines, 5D2 and 6G8, secreted MAbs specific to cooked chicken and turkey. They showed no cross-reactivity to duck or five mammalian meats (FIG. 3).

The titers of the supernatants of these five hybridoma cell lines were determined by indirect ELISA (Table 1). The protein extracts of species that MAbs could react with were coated as antigens at 2 μ g/100 μ l to the ELISA plates. The titer was represented as the highest dilution fold of supernatant where absorbance was higher than 0.1. Although MAbs 3E12 and 1A5 reacted to all three cooked poultry muscle proteins, the reaction intensity among these three species were different. Both MAbs showed the highest reactivity to turkey, followed by chicken and the lowest to duck. For MAb 5D2 which was specific to cooked chicken and turkey, the reaction titer for cooked turkey was higher than cooked chicken. Monoclonal antibody 6G8 showed the highest reactivity to cooked chicken and turkey among five MAbs and the reaction intensity was similar for both species for MAb 6G8.

All these 5 MAbs were IgG class MAbs. Four of the five hybridoma cell lines secreted IgG class MAbs subclass IgG1. Only the cell line 6F7 secreted IgG class MAb subclass IgG2b (Table 2).

Protein extracts of eight species of cooked meats were resolved by 12% SDS-PAGE and detected by Coomassie-blue staining (not shown). The results showed that extracts of three poultry species had similar protein patterns. At least fourteen, sixteen and nine protein bands were seen in the SDS-gel pattern of cooked chicken, turkey and duck protein extracts, respectively.

Protein extracts of three poultry species were separated by 12% SDS-PAGE. The resolved protein bands were transferred to a nitrocellulose membrane and detected using the undiluted supernatants containing MAbs to determine the immunogenic components in the protein extracts. The immunoblot of MAb 6F7 is shown in FIG. 4. A major band at 120 kDa in the protein extract of cooked chicken was found to react with MAb 6F7. Many minor continuous bands below 120 kDa also reacted with the MAb. The immunoblot shown in FIG. 5, shows that MAbs 3E12 and 1A5 shared the same sizes of proteins in all the three poultry species. The proteins detected by both MAbs in cooked chicken protein extract were located within 34, 30, 25 and 24 kDa. In turkey, two major bands at 29 and 22 kDa and two lesser reactive bands at 30 and 23.5 kDa were found. There was only one band at 30 kDa in duck protein extract which reacted with MAbs 3E12 and 1A5. For MAbs 5D2 and 6G8, the immunoblot indicated that the sizes of proteins which reacted with these two MAbs were the same (FIG. 6). Within chicken protein extract, there were three strong bands located at 30, 25 and 23.5 kDa and a lesser reactive band at about 35 kDa. There were strong reactions to 26 and 24.5 kDa bands in turkey protein extract for both MAbs. Two other immunoreactive bands were also present at 29.5 and 22 kDa. The result of immunoblots for these five MAbs is summarized in Table 3.

Meat adulterated samples were prepared by substituting pure cooked pork protein extract with different poultry protein extracts at 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 and 100% (vol/vol) levels. All the meat adulterants were diluted to the same concentration (2 μ g/100 μ l) then coated to the ELISA plate. The indirect ELISA using the undiluted supernatants containing MAbs was employed to quantify the substitution of pork with chicken, turkey or duck in the prepared adulterated meats. Monoclonal antibody 3E12 and 5D2 could detect the presence of 1% or less of chicken meat in pork and/or beef. The absorbance increased as the substitution of poultry meats for pork in the test meat extracts increased. Both of these two MAbs could detect 0–100% of poultry meats in a non-poultry meat sample. Zero to 100 percent of either chicken or turkey could be quantitatively detected using these two MAbs in both competitive and noncompetitive ELISA.

In addition using MAb 5D2 to determine end-point temperature of chicken with both competitive and non-competitive ELISA was feasible. Two representative figures included to demonstrate use of these MAb. See FIGS. 14 and 15.

It is not suitable to develop MAbs against native proteins for species identification of cooked samples because heat treatments result in protein denaturation or degradation. Therefore, a group of heat-denatured or heat degraded components derived from tissue are required to detect species in cooked meat. Crude cooked chicken soluble muscle proteins were used as antigens to produce MAbs. The results

demonstrated that it does not necessarily require purified antigens as a prerequisite to develop species-specific MAbs.

One hybridoma cell line of each reaction pattern was chosen to produce large amounts of antibodies in ascites fluids. The titers of these ascites fluids were tested. Titers 1:200 was determined as suitable in indirect ELISA format while titer 1:6400 was chosen for competitive ELISA format.

Muscle proteins not blood serum proteins (serum albumin) were used as antigens to produce MAbs in this study. The blood proteins are used to raise polyclonal antibodies in commercial raw meat species identification kits. Their quantity in a given sample does not necessarily parallel the amount of the corresponding species meat (Jones and Patterson (1988). Recent Developments in Meat Specification. In Immunoassays for Veterinary and Food Analysis-1, B. A. Morris, M. N. Clifford and R. Jackman (Ed), p. 121-126. Elsevier Applied Science Publishers, London, England). The amount of serum proteins is affected by the residual blood left in the muscle after slaughter (Warris (1977) *Meat Sci.* 2:155-159). Therefore, the presence of serum proteins does not essentially denote the amount of the corresponding muscle tissue. In contrast to serum proteins, the amount of muscle protein is proportional to the presence of lean meat. It is suitable to be used for both qualitative and quantitative analysis in meat species identification (Martin et al. (1991) *Meat Sci.* 30:23-31).

Detection of small amounts of substituted meat supplies is a concern of consumers and regulatory agencies. The present assay was adequate to illustrate a quantitative detection over a wide range of mixture levels (0-100%). Development of a sandwich ELISA or the use of an avidin-biotin immunoassay (Klein (1990) Antigen-antibody interactions. In *Immunology*, p. 294-310. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England) would increase the sensitivity of the developed MAbs to quantify poultry adulterant in red meat products.

Poultry may be added into pork product due to the similar light color. The unmarketable trimmings of poultry may also be substituted into other red meats. Poultry requires a minimal internal temperature of 71.1° C. to kill Salmonella. (USDA-FSIS (1994) Requirements for the production of poultry breakfast strips, poultry rolls, and certain other poultry products. Animals and Animal Products. Part 381.150, p. 495-496 of Chapter III. Title 9 of the Code of Federal Regulations, Office of the Federal Register, National Archives and Records, Washington, D.C.). If beef or lamb product contaminated with poultry was not fully cooked, it might cause Salmonellosis. Hsieh et al. (1995) reported that 18% and 38% of ground pork and pork sausage samples analyzed were contaminated with poultry using ELISA, respectively. About 31% of ground beef and ground veal samples was also contaminated with poultry (Hsieh et al. (1995) *J. Food Prot.* 58:555-559). A high percentage of adulteration with multiple species was also found in the ground pork and ground beef samples. The developed MAbs 3E12 and 1A5 could react with three poultry species and MAbs 5D2 and 6G8 could react with chicken and turkey. Therefore, these MAbs could be used in ELISA to detect the presence of poultry as a group in the cooked red meat products in a single test. It would be highly suitable and economical for an initial rapid screening of meat samples. Then MAbs 6F7 could be used for the specific identification of chicken adulterant in a positive sample. Furthermore, a convenient field test kit could be developed using these MAbs for meat inspectors.

TABLE 1

Titration of monoclonal antibodies against cooked poultry by indirect ELISA ^a			
MAbs	chicken	turkey	duck
6F7	128	—	—
3E12	64	256	32
1A5	64	128	32
5D2	64	128	ND
6G8	512	512	ND

^aTiters were represented as the highest dilution of supernatants that had absorbance above 0.1.

TABLE 2

The isotypes of MAbs specific to cooked poultry	
MAbs	Ig isotype
6F7	IgG2b
3E12	IgG1
1A5	IgG1
5D2	IgG1
6G8	IgG1

TABLE 3

Immunogenic components of SDS-PAGE-separated proteins extracted from poultry meats.			
MAbs	chicken	turkey	(kDa)
6F7	120	ND ^a	ND
3E12	34; 30; 25; 24	30; 29; 23.5; 22	30
1A5	34; 30; 25; 24	30; 29; 23.5; 22	30
5D2	35; 30; 25; 23.5	29.5; 26; 24.5; 22	ND
6G8	35; 30; 25; 23.5	29.5; 26; 24.5; 22	ND

^anot detectable

EXAMPLE 2

MATERIALS AND METHODS

Extraction of Cooked Meat Soluble Proteins

Muscle samples were purchased from a local supermarket (lamb, turkey and duck) or obtained from the Auburn University Meats Laboratory (pork, beef and chicken) and College of Veterinary Medicine (horse and deer), Auburn University.

Extraction of soluble proteins was performed as follows. Samples from each species was blended separately. Thirty grams of trimmed, lean meat from each species were cut into small pieces and blended separately by blender (Virtis Model 45, Gardiner, N.Y.) for 1 minute. Three fold (w/v) of deionized water was added to each sample. These homogenates were cooked and boiled at 100° C. for 15 minutes. The soluble proteins were extracted by gentle agitation of these homogenates for 2 hours at 4° C. then centrifuged at 14,300×g at 4° C. for 30 minutes (Beckman J-21C, Palo Alto, Calif.). Supernatants were filtered through Whatman No 1 filter paper (Maidstone, Kent, England) and stored at -80° C.

The protein concentration of the extracts was determined by Bio-Rad protein assay kit II according to manufacturer's protocol (Bio-Rad, Hercules, Calif.). The assay was based on the method of Bradford (1976) *Anal. Biochem.* 72:248-254. Bovine serum albumin was used as standard in this assay.

Mice Immunization

The antigen used for immunization was protein extract of cooked pork described previously. Four 10-week-old female BALB/c mice (PRN 9612-R-0597) were immunized intraperitoneally or subcutaneously with approximately 0.4 ml of an emulsion containing equal volumes of antigen (50 µg of cooked pork soluble protein) and complete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, Mo.). Three weeks later, mice were boosted with the same dose of antigen emulsified in incomplete Freund's adjuvant (Sigma). Sera were collected by tail vein bleeding one week after the booster. The sera were used to test specific antibody production by indirect ELISA. Four days before fusion, a final booster was done by injecting intraperitoneally with 50 µg of antigen suspended in 200 µl 0.01M pH 7.2 phosphate buffered saline (PBS).

Production of Monoclonal Antibodies

Four days after the final booster, the injected mouse was sacrificed by cervical dislocation. The spleen was removed aseptically and cells were teased and flushed from spleen by a large blunt forceps and 10 ml of wash media (RPMI-1640 supplemented with 1% oxaloacetate, pyruvate, and insulin (OPI), 1% glutamine, 1% penicillin and streptomycin (p/s)) (Sigma) in a 10 ml syringe. The spleen cells were fused with murine myeloma cell line P3x63, Ag8.653, ATCC CRL 1580, in a 2:1 ratio by using 50% polyethylene glycol (PEG) 4000 (Sigma) as the fusion agent. One ml of 50% PEG was gently added to the cells dropwise. After standing for 1 minute, 30 ml of wash media was added to cells dropwise. The fused cells were resuspended in Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) selective growth medium (RPMI-1640 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 1% OPI, 1% glutamine, 1% p/s and 1% HAT) (Sigma) and seeded in 96-well tissue culture plates set with mouse thymocyte feeder cells. The hybridoma cells were incubated at 37° C. with 5% CO₂ (Napco CO₂ incubator model 6300, Tualatin, Oreg.).

Hybridoma cell growth was apparent 10 to 14 days after fusion. When the culture fluids became acidic, the hybridoma supernatants were screened by indirect ELISA against cooked pork antigen. Hybridoma supernatants from the positive wells were also tested against protein extracts from cooked beef, lamb, deer, horse, chicken, turkey and duck.

Antibody-producing hybridoma cells of interest were selected and recloned two times by limiting dilution (Campbell, 1991). Cells were diluted with complete growth media (RPMI-1640 supplemented with 15% FBS, 10% OPI, 1% glutamine and 10% p/s) to give a concentration of 0.5 cell or 1 cell per well. Two hundred µl of each dilution were plated into each well of 96-well plates seeded with mouse thymocyte feeder cells. The recloned hybridoma cells were screened using the method described previously. The antibody-producing hybridoma cells of interest were expanded to 48-well, 24-well, 12-well plate, small and large petri dish, sequentially. Finally, they were frozen and stored in liquid nitrogen (Procedure B, page 32).

Production of Ascites Fluid

For producing large amount of MAbs, normal adult BALB/c mice were primed intraperitoneally with 0.5 ml of pristane. One week later, the mice were inoculated intraperitoneally with 1×10⁷ hybridoma cells in 500 µl of PBS. Approximately 10 to 14 days after inoculation, ascites fluid was collected daily for a week. Ascites fluid containing MAbs was centrifuged at 2,000×g for 5 minutes to remove cells then stored in a sterile centrifuge tube at 4° C.

ELISA

Indirect non-competitive ELISA was used in this study. Two µg of pork antigen or protein extracts from eight cooked

meat species in 100 µl of carbonate buffer (0.06 M pH 9.6) was coated to each well of 96-well round-bottomed vinyl microtiter plate (Costar, Cambridge, Mass.) and incubated for 1 h at 37° C. or at 4° C. overnight. After washing three times with 0.01M phosphate buffered saline, pH 7.2, containing 0.5% Tween-20 (PBST) using an microplate washer (Bio-Rad model 1250), 100 µl of 1% bovine serum albumin (Sigma) in PBS were added to each well to block nonspecific binding sites and the plate was incubated for 1 h at 37° C. After washing three times with PBST, 100 µl of hybridoma cell supernatant were then added to each well and incubated for 1 h at 37° C. After another three washes with PBST, 100 µl of diluted (1:3000 in PBS) horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Bio-Rad) were added. Following incubation for 1 h at 37° C., the plate was rinsed three times with PBST, and 100 µl of substrate solution containing 2,2'-azino-di-[3-ethyl-bezthiazoline-6-sulfonic acid] and hydrogen peroxide (Bio-Rad) was added to each well. After 10 min incubation at 37° C., the reaction was stopped by adding 50 µl of 10% oxalic acid and the absorbance was measured at 415 nm with a microplate reader (Bio-Rad model 450).

Isotyping of MAb

The isotype of MAb was determined by a mouse monoclonal antibody isotyping kit according to manufacturer's protocol (Sigma).

Protein Extract Concentrating

Protein extracts of cooked meats were concentrated by ultrafiltration (Model 8050, Amicon, Beverly, Mass.) using a YM-10 membrane (Amicon). Nitrogen was applied to the system at 2114 g/cm² to facilitate the filtration process.

SDS-PAGE and Western Immunoblotting

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to resolve the protein extracts of different cooked meat species. Western blot was then carried out to transfer proteins from gel to nitrocellulose membrane and to determine the molecular weights of proteins which reacted with developed MAbs. A Mini-Protean II electrophoresis unit (Bio-Rad) was used to perform SDS-PAGE. Proteins were separated on 4% acrylamide stacking gel (pH 6.8) and a 12% acrylamide separating gel (pH 8.8). The concentrated protein extracts of different cooked meat species were diluted with equal volume of sample buffer containing 2% (wt/vol) SDS, 5% (vol/vol) 9-mercaptopethanol, 60 mM Tris hydrochloride (pH 6.8), 25% (vol/vol) glycerol and 0.0001% (wt/vol) bromophenol blue (Laemmli (1970) Nature 227:680–685), boiled for 2 minutes, cooled and applied to the gel at approximately 10 µg per well. A constant voltage of 200 V was applied on the gel for 45 minutes by using a power supply (Model power pac 3000, Bio-Rad). After electrophoresis, the resolved protein bands were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) by the method of Towbin et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:43504354, using a electroblotting apparatus (Bio-Rad). Blotting was performed at 100 V for 1 hour in blotting buffer containing 20 mM Tris, 250 mM glycine and 20% methanol. Upon completion of the electroblotting, the nitrocellulose membrane was soaked in 3% gelatin (Bio-Rad) in PBS for 30 minutes to block the unspecific binding sites. The membrane was incubated with hybridoma supernatant in antibody buffer (1% gelatin in TBST) overnight at room temperature after two washes in Tris-buffered saline with Tween (TBST) (TBS, pH 7.5, containing 0.05% Tween-20). Following two washes in TBST to remove the excess MAb, the membrane was incubated with goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate diluted in antibody buffer (1:3000) for 1 hr at room temperature. After

15

washing with TBST two times, and an additional wash with TBS, the membrane was incubated with 5-bromo4-chloro-3-indolyl phosphate/ p-nitroblue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) in alkaline phosphatase color development solution (0.1M, pH 9.5 Tris buffer) (Bio-Rad). When dark purple bands which indicated the antibody binding site appeared on the membrane, the reaction was stopped by washing the membrane in distilled water. The prestained PAGE broad range standards including myosin (M. Wt. 205,000), β -galactosidase (M. Wt. 116,500), bovine serum albumin (M. Wt. 80,000), ovalbumin (M. Wt. 49,500), carbonic anhydrase (M. Wt. 32,500), soybean trypsin inhibitor (M. Wt. 27,500), lysozyme (M. Wt. 18,500) and aprotinin (M. Wt. 6,500) were used as molecular weight markers in Western immunoblotting.

Preparation of Adulteration Standards

The protein extract of cooked pork and/or beef was used as adulterant to cooked chicken. A different percentage (vol/vol) (0, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100%) of adulterating protein extract was mixed with pure protein extracts of cooked chicken, respectively. Protein concentration was calculated for each mixture according to the amount of protein in each pure protein extract.

RESULTS

During the screening process, numerous hybridoma clones produced MAbs against the cooked pork antigen. After recloning and testing cross-reactivity to other species (beef, lamb, deer, horse, chicken, turkey and duck), only one stable hybridoma cell line, 2F8, which secreted IgG2b type of MAb, was chosen. Because IgM antibodies are generally harder to purify and store, they were avoided in this study by selecting only IgG MAbs using IgG T-chain specific probes, i.e., enzyme conjugated goat anti-mouse IgG (H&L) was used as the secondary antibody in the ELISA screening procedures. MAb 2F8 reacted with all five cooked mammalian muscle proteins (pork, beef, lamb, deer and horse) but showed no cross-reactivity to poultry muscle proteins (chicken, turkey and duck) or raw lamb and deer proteins (FIG. 7). A slight increase of ELISA background absorbance (<0.2) was observed in raw pork, beef and horse. Results suggested that proteins reacted with MAb 2F8 might be heat-denatured or heat degraded soluble proteins. This can be explained by the fact that after the heat treatment, the proteins unfolded and exposed epitopes which could be recognized by MAb 2F8. Native proteins, however, did not react to this MAb.

The titers of the supernatant and ascites fluid of hybridoma cell line 2F8 against cooked proteins of each species were also determined by indirect ELISA (Table 4). The titer was represented as the highest reciprocal dilution fold that still gave an absorbance higher than 0.1 MAb 2F8 showed a higher reactivity to pork, beef and horse than lamb and deer. The reactivities to cooked pork, beef and horse were similar, while the reactions to cooked lamb and deer were slightly weaker. Both the supernatant and ascites fluid showed high titers to the five cooked mammalian muscle proteins.

A pure immunogen is not necessary for developing a desirable MAb and a MAb is not necessarily monospecific. In this study, a partially purified pork protein extract was used as immunogen because antiporcine antisera usually show strong reactivity to pork proteins as well as other mammalian proteins before eliminating the cross-reactive antibodies by affinity columns (unpublished observation). MAb 2F8 was purposefully induced and selected to react with common motifs in the proteins of five taxonologically related mammalian species.

16

Although MAb 2F8 could react to all five cooked mammalian muscle proteins, the components it reacted with were different among species. (FIG. 8). From the result of Western blotting, we found that the protein extracts of all five mammalian meats showed two or more protein bands reacting with MAb 2F8 (FIG. 2) indicating that cooked meat proteins may be multivalent antigens. It could also be the identical sequential determinants carried by degradation products of different sizes. The molecular size of these immunogenic components were small, ranging from 6.5 to 26.5 kDa, suggesting that they were either small proteins or heat degraded protein subunits or peptides. The dye front protein band (6.5 kDa) was present in all five species. Because pork muscle proteins were used as the immunogen to develop the MAbs, pork had the most immunogenic components (6 bands) that reacted with MAb 2F8. Beef showed 2 bands, horse 3, lamb 4, and deer had 2 bands. The number of immunogenic components in each species, however, did not correspond to the reactivity of MAb 2F8 to each species from ELISA responses. Epitopes available for antibody binding depend on antigen concentration and conformation. Some epitopes may be embedded inside of the antigen but were exposed after SDS-denaturation and thus be recognized by MAb 2F8.

The MAb 2F8 was further used to detect and quantify the amount of five mammalian animal meats in cooked chicken meat mixtures by ELISA. As shown in FIG. 3, the absorbance values increased proportionally with the increase of the amount of target species until a 15% substitution of pork, beef or horse was achieved in chicken. Because of the strong reactivity of MAb 2F8, the absorbances for the substitution higher than 15% were overscaled. At least 0.5% of adulteration of pork, beef, horse, and lamb could be detected using this MAb in indirect ELISA. For the substitution with lamb, the absorbance was proportional to the concentration of lamb meat in the range 0–50%. The substitution with deer showed the lowest reactivity with 5% and above of deer substitution being detected. The absorbance was not overscaled until it reached 75% of substitution with deer in chicken. The detection limit of this assay was defined as two standard deviation apart from the mean reading of the meat matrix containing no mammalian meat. The assay showed a good discrimination between chicken containing no mammalian meats and those containing a low amount of these meats.

Martin et al. (1991) *Meat Sci.* 30:23–31, detected 1–100% chicken meat in the mixture of raw beef and pork by a MAb-based sandwich ELISA. By using polyclonal antibodies-based ELISA, beef containing 0.5% of pork and beef products with 1% of the lean pork could be differentiated visually Oones and Patterson (1985) *Meat Sci.* 15:1–13). Stevenson et al. (1994) *Food Agric. Immunol.* 6:297–304, also reported the detection of chicken in beef at 1% level by indirect ELISA with polyclonal antibodies as capture reagent. All of the antibodies mentioned above were developed to identify one species at a time. Recently, Billett et al. (1996) *J. Sci. Food Agric.* 70:396–404, developed MAb to detect a group of poultry meats (chicken, turkey, pheasant and duck) at the 100 g per kg (10%) mixed meats level. MAb 2F8, however, has potential to be used for detection and quantification of mammalian meats in cooked poultry meats at low levels of adulteration (0.5%) and over a wide range of adulteration levels. Research in optimizing ELISA method employing other formats such as, double sandwich ELISA, competitive ELISA and using streptavidin-biotin amplification system, is ongoing in our laboratory to further increase the detection limit and achieve quantitative measurements in various types of meat product.

When cooked chicken meat was adulterated with a mixture of beef and pork, the ELISA absorbance reflected the total amount of the two adulterating species (Table 5). The mean absorbance readings ranged 0.802 to 1.149 and 1.644 to >2 for a total of 5% and 10% level of substitution, respectively. The absorbance was overscaled for all combinations of 15% substitution. Results suggested that although differentiating species among the five mammalian meats was not possible, a total amount of mammalian meat adulterants could be semiquantitatively determined using MAb 2F8.

The consumption of poultry has been increasing due to health concerns of less saturated fat and a lower price in comparison to mammalian meats. Hsieh et al. (1995) *J. Food Prot.* 58:555–559, reported that beef or sheep meats were found as contaminating species in ground turkey on retail markets. The reasons for substituting cheaper meat such as poultry with more expensive meat like beef and sheep include the use of the unmarketable trimmings from expensive meats and improper cleaning of the grinder between each change of meat species for grinding. The widespread species adulteration in retail markets may be attributed to the inadequate meat inspection and the lack of a suitable and affordable analytical method. Using ELISA with MAb 2F8, the presence of any of the five mammalian meat adulterants in a cooked poultry could be detected with a single test visually or semiquantitatively. The developed MAb should be useful in an initial rapid screening test for a large number of samples in a laboratory and it can be made into a field test kit for meat processors and inspectors to be used on site. Money and time could be saved, reserving resources so even more samples could be tested and more retail stores inspected. Furthermore, this MAb can be used for not only cooked but raw meat species identification. For testing raw meats, only an additional heat treatment (100° C., 15 min) is required during sample preparation.

TABLE 5

Indirect ELISA response expressed as absorbance (A) at 415 nm for cooked chicken substituted by various combinations of cooked pork (P) and beef (B) at total concentrations of 5%, 10%, and 15% by weight.

5%	A _{415a}	10%	A ₄₁₅	15%	A ₄₁₅
1% P +	0.840 ± 0.031 ^a	1% P +	1.671 ± 0.097	2% P +	>2
4% B		9% B		13% B	
2% P +	0.873 ± 0.009	3% P +	1.781 ± 0.027	5% P +	>2
3% B		7% B		10% B	
3% P +	0.802 ± 0.003	5% P +	1.604 ± 0.025	8% P +	>2
2% B		5% B		7% B	
4% P +	1.149 ± 0.032	8% P +	>2	10% P +	>2
1% B		2% B		5% B	
5% P	1.014 ± 0.015	10% P	>2	15% P	>2
5% B	1.008 ± 0.011	10% B	1.775 ± 0.021	15% B	>2

^aValues represented are means ± SD (n = 6).

TABLE 4

Titration of monoclonal antibodies against cooked five land animal meats by indirect ELISA^a

MAb 2F8	SupernatantAscites Fluid
pork8192 ^b 6.6 × 10 ⁶	
beef81926.6 × 10 ⁶	
lamb40963.3 × 10 ⁶	
deer40963.3 × 10 ⁶	
horse81926.6 × 10 ⁶	
chicken41600	

TABLE 4-continued

Titration of monoclonal antibodies against cooked five land animal meats by indirect ELISA^a

MAb 2F8	SupernatantAscites Fluid
turkey81600	
duck41600	

^aTiters were represented as the highest dilution of supernatants that had absorbance above 0.1.

^bMeans of triple readings.

PROCEDURE A. RETRIEVE MYELOMA CELLS FROM LIQUID NITROGEN

1. retrieve myeloma cells from liquid nitrogen
2. put the vial into a 37–39° C. water bath to thaw the cells
3. add 9 ml of growth media (RPMI-1640, 10% FBS, 1% p/s) drop by drop to resuspend the cells
4. centrifuge at 1,700 rpm for 5 min
5. resuspend cell pellet in 5 ml of growth media
6. perform the cell count
7. centrifuge at 1,700 rpm for 5 min
8. resuspend the cells in 5 ml of growth media
9. transfer the cells to the petri dish

PROCEDURE B.

PROCEDURE OF FREEZING HYBRIDOMA CELLS

1. Scrape cells from the petri dish
2. centrifuge at 1700 rpm for five minutes to get cell pellet
3. resuspend cell pellet with 500 µl of CGM
4. Add 500 µl of freeze media containing six parts of FBS, two parts of CGM and two parts of dimethyl sulfoxide (DMSO) drop by drop
5. Cell suspension was transferred to a cryogenic vial and stored in liquid nitrogen.

EXAMPLE 3

METHODS

Sample Preparation

Beef was trimmed off external fat and connective tissue and ground twice using a hand grinder. Samples were stored in a freezer at -20° C. until use. After thawing, eight grams of ground beef were packed into the bottom section of 22 mm×150 mm glass tubes. Temperature was monitored by inserting a stainless steel probe into the geometric center of the sample. The glass tubes with sample were placed in a temperature-controlled circulated water bath maintained at desired target temperatures. When internal temperature of the sample reached the target temperature (0–100° C.), tubes were removed and immediately cooled in an ice-water bath.

Cooked beef samples were homogenized in 1:3 volumes (w/vol) of 0.85% NaCl. The slurry was centrifuged at 5,000×g for 15 min at 4° C. The supernatant was filtered through a Whatman no. 1 filter paper. Soluble protein content of the filtrate was determined by dye binding assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as standard. ELISA Procedure

Optimization of the ELISA procedures was achieved by cross titration of antigen (meat extract) and antibody. The indirect ELISA was performed by coating polyvinyl micro-titer wells with 100 µl of 0.1M carbonate buffer (pH 9.6) containing 0.25 µg of soluble proteins from the extract. Plates was incubated at 37° C. for 1 hr and placed in a refrigerator at 4° C. overnight. Wells were washed three times with PBST and remaining binding sites were blocked

by adding 150 μ l of 1 % BSA-PBS and incubating at 37° C. for 1 hr. MAb 2F8 diluted 1:6400 in PBS was added to wells (100 μ l per well); plate was incubated for 1 hour at 37° C. After washing with PBST, IgG peroxidase conjugate diluted (1:2500) in PBS was added to each well. Plate was incubated for 1 hr at 37° C. and washed five times, and bound peroxidase was determined with ABTS substrate. Absorbance was read at 405 nm using a Microtiter plate reader (Bio-Rad).

SDS-PAGE and Western Blotting

SDS-PAGE was used to determine protein composition of the meat extracts. Soluble proteins were separated on a 12% acrylamide gel using a Mini-Protein II electrophoresis unit (Bio-Rad). The resolved protein bands were transferred electrophoretically from the SDS-PAGE gel to a nitrocellulose membrane. The reaction of proteins with MAb 2F8 was detected by goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate followed adding of the enzyme substrate.

Results and Discussions

ELISA response to the beef extract showed a temperature-dependent reactivity (FIG. 9). Binding of MAb2F8 to soluble proteins of beef extract was extremely low when samples were cooked to end-point temperatures of 60° C. or below. ELISA responses slightly increased as cooking temperature increased from 60° C. to 66° C.; increased rapidly and constantly from 66° C. to 80° C. Temperature required for denaturing the majority of beef soluble proteins has been observed within the range of 60° C. to 80° C. Meat extracts from different cooking temperatures can be differentiated at least at 2° C. intervals ranging from 66° C. to 80° C. ($P<0.05$). A linear increase of the reactivity, with a correlation coefficient of 0.997, was also observed as increase of the end-point temperature from 66° C. to 80° C. (FIG. 10). These results suggest that determination of end-point temperature of cooked beef can be achieved within this range using MAb 2F8.

Soluble protein patterns at different temperatures were obtained by SDS-PAGE of the cooked beef extracts (not shown). Solubility of muscle proteins decreased rapidly when beef was heated between 50° C. and 70° C. and remained fairly constant above 80° C. The binding of MAb 2F8 to the antigen was further examined by Western Blot (FIG. 11). MAb bound to proteins with molecular weight of 21 KD and others with molecular weight smaller than 19.4 KD in all cases; in addition, several soluble proteins with large molecular weight could also be detected by the MAb when beef was heated below 70° C. or when the raw meat extract was denatured by SDS treatment. It appeared that this MAb recognized a group of soluble proteins which contribute a common epitope on their surface after denaturation. As the heating temperature increased, most of the proteins which were present in the raw meat extract became insoluble; only the proteins retained in the cooked meat extract were detected by the MAb. Because of the same amount of proteins was applied in our ELISA procedures, the increase of the reactivity was attributed to the increase of thermally induced changes of the proteins as detected by the MAb. It may be that heat treatment induces the structural changes of the protein molecules and exposes the epitope region which is absent or rare on the native molecules. The changes may be conformational or alternatively may be due to the fragmentation of native proteins. Proteins with varied sensitivity to heat treatment expose these epitope at different temperature range; this can be a possible reason for the observed temperature-dependent responses in our ELISA procedures.

These finding leads us to propose the use of denatured soluble proteins as an indication of end-point temperature of

cooked meat products. Most of the currently developed methods were based on detection of single protein marker or enzyme activity. The distribution of the protein or enzyme, however, varies depend on the different portion of muscle tissue. Detection of proteins as a group in terms of their immunoreactivity after denaturation appears to be less influenced by these factors.

Undercooked meat products are responsible for numerous foodborne outbreaks. Valid methods for evaluating the adequacy of heat processing in cooked meat will significantly reduce this risk of the consumer. Most currently developed methods were based on the decrease of protein solubility or residual enzyme activity as an indication of EPT. They have inherent limitations including the relatively low sensitivity, narrow temperature range and variation among different muscle tissues. USDA-FSIS suggested that new approaches should be explored, such as determining the increases of some chemical compounds as EPT increases (Ang, et al., 1994).

As is evident in our study, using MAb as a probe to detect the heat induced conformational changes of the soluble muscle is feasible. The most attractive features of our proposed approach are: (1) Measurements based on the protein denaturation are positively related to heat treatment; (2) High sensitivity of ELISA provides accurate and rapid screening of a large number of samples; (3) Monitoring the denaturation of a group of proteins has less variation than a single protein marker, and (4) Wide temperature range application is possible. The developed MAb based ELISA may be commercialized as test kit for use by the food industry, food service operations and regulatory agencies.

EXAMPLE 4

MONOCLONAL ANTIBODIES FOR DETECTION OF PORK

Methods for identification of raw meat based on ELISA have been well established (Whittaker, R. G., Spencer, T. L., and Copland, J. W. (1983) *J. Sci. Food Agric.*, 34:1143–1148; Griffiths, N. M., and Billington, M. J. (1984) *J. Sci. Food Agric.* 35:909–914; Patterson, R. M., Whittaker, R. G., and Spencer, T. L. (1984) *J. Sci. Food Agric.* 35:1018–1023; Jones, S. J., and Patterson, R. L. S. (1986) *J. Sci. Food Agric.* 37:767–775; Martin, R., Azcona, J. I., Casas, C., Hernandez, P. E., and Sanz, B. (1988) *J. Food Prot.* 51:790–794; and, Ayob, M. K., Ragab, A. A., Allen, H. C., Farag, R. S., and Smith, C. J. (1989) *J. Sci. Food Agric.* 49:103–116). Detection of species adulteration in cooked meats appears to be more complicated than in the raw meats because heat induces denaturation of most immunogenic proteins. Therefore, the antigens for cooked meat identification should be able to withstand cooking or can be renatured after heating.

Hybridoma techniques, developed by Kohler and Milstein enable continuous production of MAbs with defined specificity (Kohler, G., and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495–497). MAbs have been applied to ELISA for raw meat identification (Martin, R., Wardale, R. J., Jones, S. J., Hernandez, P. E., and Patterson, R. L. S. (1991) *Meat Sci.* 30:23–31; Garcia, T., Martin, R., Morales, P., Haza, A. I., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B., and Hernandez, P. E. (1994) *J. Sci. Food Agric.* 66:411–415; Morales, P., Garcia, T., Gonzalez, I., Martin, R., Sanz, B., and Hernandez, P. E. (1994) *J. Food Prot.* 57:146–149; Bilett, E. E., Bevan, R., Sanlon, B., Pickering, K., and Gibbons, B. (1996) *J. Sci. Food Agric.* 70:396–404). However, MAbs are not available for detection of species adulteration in cooked meat prod-

21

ucts. The production of species-specific MAbs to the thermal-stable muscle proteins (TSMPs) provide an unlimited supply of uniform reagents capable for both raw and cooked meat identification. Therefore, the present invention provides (1) MAbs specific to pork TSMPs, (2) porcine-specific MAbs and their correspondent antigens, (3) a MAb-based ELISA for detection of pork in raw and cooked meat products.

MATERIALS AND METHODS

Antigen Preparation

TSMPs from pork were prepared by modifying the method described by Milgrom and Witebsky (1962) *Immunology* 5:46-66. Briefly, after removing fat and connective tissue, skeletal muscle tissue (100 g) was homogenized in 0.15M CaCl (1:2 w/v) using an Brinkmann Polytron Homogenizer (Model PT 10/35, Brinkmann Instruments Co., Westbury, N.Y.). The slurry was further sonicated (50W, 20 KHz, 5 min.) with a Model 4710 Ultrasonic Processor (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, Ill.), heated in boiling water for 20 min, and centrifuged at 2,000 g for 30 min. The supernatant was autoclaved at 121° C. for 30 min, centrifuged at 5,000 g for 30 min and filtered through Whatman No. 1 filter paper. The precipitate was formed by adding 90% ethanol (1:3.74 vol/vol) and dried in a convection oven at 37° C.

Immunization

The dry material was dissolved in a small amount of saline solution; the protein concentration of the preparation was determined by a Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, Calif.) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Four female BALB/c mice (6-8 weeks) were injected either intraperitoneally or subcutaneously with 100 µg/mouse of the TSMPs in 200 µl phosphate buffered saline (PBS, 0.15M NaCl, 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.2) emulsified with same volume of Freund's complete adjuvant. Four Boost injections prepared in the same manner using Freund's incomplete adjuvant were applied to each mouse at four week intervals. Test sera from mice were collected eight days after each boosting by tail bleeding; titer of the sera was determined by ELISA. The mouse showing the highest titer was injected intraperitoneally with 100 µg of TSMPs in PBS four days before fusion.

Monoclonal Antibody Production

The spleen cells from the immunized mouse were fused with myeloma cells for hybridoma production. The general procedures as described by Kohler and Milstein were followed with necessary modification to be performed in our laboratories (Kohler, G., and Milstein, C. (1975) *Nature*). Hybridomas were initially screened for reactivity to cooked pork extract by ELISA 10 to 14 days after fusion. The positive clones from the wells of original fusion plates were then transferred to larger wells and cultured for 2-3 more days; the culture supernatants were collected and tested against cooked meat extracts of other species. The hybridomas secreting antibodies react only with pork were selected and cloned twice by limiting dilution. MAbs were obtained in supernatants from propagated cell cultures and in ascitic fluid from mice inoculated with hybridoma cells. The isotype of MAbs were determined by a Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) following the manufacturer's instruction.

Epitope Comparison

A convenient ELISA method developed by Friguet et al. was adapted for comparison of relative binding sites of MAbs on the antigen (Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., Pages, J., Bussard, A., and Goldberg, M. (1983) *J. Immun. Meth.* 60:351-358). Cooked meat extract from pork (0.5 µg

22

protein/well) was coated onto the microtiter plate. The optimal dilution of each MAb was determined by checkerboard titrations to ensure sufficient antibody to saturate the antigenic sites of TSMPs. Same volume (50 µl each) of diluted MAbs to be compared was added to the well simultaneously; the amounts of bound antibody were quantitatively measured using procedures as described in the ELISA method.

Sample Preparation and Extraction

Meat samples of different origin (pork, beef, lamb, horse, deer, chicken, turkey, and duck) were obtained fresh and ground separately in our laboratory; ground meat samples were stored at -20° C. until use. Adulterated meat samples were prepared by mixing known amounts of pork (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 and 800 g/kg) in either beef or turkey. Cooked samples were prepared by packing 10 g of meat in 1.5×15 cm glass tubes and heating in boiling water for 20 min. Raw and cooked samples were extracted by adding 20 ml of saline solution to 10 g of meat and homogenizing in an Brinkmann Homogenizer. The slurry was set at 4° C. for 2 hr and filtered through a Whatman No. 1 filter paper. The protein concentration of the filtrate was determined using a Protein Assay Kit (Bio-Rad).

Indirect ELISA

Wells of microtiter plates (polyvinyl chloride plates, Costar, Cambridge, Mass.) were coated with 100 µl of meat extracts diluted in 0.06M carbonate buffer (pH 9.6) at 37° C. for 1 hr; the protein content for coating was 2 µg/well for antisera titration, hybridomas screening, and meat sample analysis, and 0.5 µg/well for epitope comparison. Plates were washed three times with 200 µl of PBS containing 0.05% (vol/vol) Tween 20 (PBST) using a microplate washer (Bio-Rad, Model 1250) and incubated with 200 µl of blocking solution (1% BSA in PBS) at 37° C. for 1 hr to minimize nonspecific binding followed by another washing steps. Optimal dilutions for each MAbs were predetermined by checkerboard titrations. MAbs appropriately diluted in blocking solution (100 µl) were added to the well and the plate was incubated at room temperature for 1 hr. After washing the plate, 100 µl of horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Bio-Rad) diluted 1:2500 in blocking solution was added to each well. The plate was incubated at room temperature for another 1 hr and washed six times before the addition of 100 µl of substrate solution (22 mg of 2,2'-azino-di-[3-ethyl-benothiazoline-6-sulfonicacid] and 15 µl of 30% hydrogen peroxide in 100 ml of 0.1M phosphate-citrate buffer pH 4.0). Color development was processed at room temperature for 30 min and the enzyme reaction was stopped by adding 100 µl of 0.1M citric acid to each well. Absorbance of each well was measured by a microplate reader (Bio-Rad, Model 450) at 415 nm.

Electrophoresis and Immunoblotting

Soluble proteins of meat extracts were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a Mini-Protein II electrophoresis unit and a power supply Model 3000 (Bio-Rad) with stacking and separating gels of 4 and 12% acrylamide, respectively. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R 250 and the apparent molecular weight of bands was calculated using a calibrating curve constructed from molecular weight standards. Soluble proteins of meat extracts were transferred electrophoretically (1 hr at 100V) from gel to nitrocellulose membrane using a Mini Trans-Blot unit (Bio-Rad) with 25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% (vol/vol) methanol buffer (pH 8.3). Upon completion of the transferring, the membrane was washed with TBST (20 mM

Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5), blocked with 20 ml of 3% gelatin in PBS for 1 hr, and incubated with 20 ml of ascitic fluid diluted 1:2000 in antibody buffer (1% gelatin in TBST) 2 hr at room temperature. The excess antibody was removed by washing with TBST, and the membrane was incubated with 20 ml of goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate diluted 1:3000 in antibody buffer for 1 hr at room temperature. After washing, the membrane was incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ p-nitroblue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) in 0.1 M Tris buffer, pH 9.5. The color development was observed between 10–20 minutes and straining was stopped by washing the membrane with distilled water.

RESULTS AND DISCUSSION

Species Specificity of MAbs

Four hybridoma cell lines, designated as 2E2, 5H8, 5H9 and 8A4, were selected after screening of supernatants from all wells of fusion plates. Isotype of MAbs secreted by these hybridomas was determined as IgG1 subclass. The quantity of MAbs was obtained in ascitic fluid for subsequent analysis; purification of MAb from ascitic fluid was not necessary because no significant nonspecific binding was observed and the ELISA performance was satisfactory when direct dilution of ascitic fluid was used. All MAbs reacted strongly with cooked pork extract and showed no cross-reaction with cooked meat extracts from beef, lamb, horse, deer, chicken, turkey and duck as determined by indirect ELISA (FIG. 12). A similar reaction pattern among the species also was observed for all MAbs when raw meat extracts were tested. The ability of the MAbs to detect both raw and cooked pork evidenced the heat resistance of the TSMPs which was present in raw meat and remained soluble and antigenic after cooking. During the checkerboard titrations, MAb 5H9 consistently showed higher maximum binding than the other three MAbs; this might be an indication of highest affinity of 5H9 among the four MAbs. Morales et al. produced a MAb specific to porcine muscle proteins for meat speciation (Morales, P., Garcia, T., Gonzalez, I., Martin, R., Sanz, B., and Hernandez, P. E. (1994) *J. Food Prot.* 57:146–149). Their method was able to detect the presence of pork in raw meat but not cooked products. The MAbs produced in this work is the first reported MAbs capable for identification of pork in both raw and cooked status.

Porcine-Specific TSMP

The ability of the MAbs to differentiate equivalent protein bands of pork from other species was observed when proteins were transferred from gel to nitrocellulose membrane and probed by MAbs to reveal the immunoreactive components in raw and cooked meat extracts. It is clear that all four MAbs reacted with proteins of pork origin but not with proteins from beef, lamb, horse, deer, chicken, turkey and duck. The results confirmed the porcine-specificity of MAbs observed previously by indirect ELISA. All of the MAbs showed the same reaction pattern on the immunoblot; three protein bands with an apparent molecular weight of 24, 22, and 20.5 kD in raw pork were recognized while only one protein band with a molecular weight of 24 kD was detected in cooked pork by all four MAbs. (FIG. 13) Failure to detect the two protein bands (22 and 20.5 kD) in cooked meat extract indicated the absence of these proteins which may become insoluble after heating. The 24 kD protein present in both raw and cooked pork extract was identified as porcine-specific TSMP. Several researchers have attempted to resolve the thermal-stable components of different meat species. Jones and Mortimer demonstrated that the thermal-stable proteins eluted in a low pH range (3.5–6.5) and characteristic pattern of thermal-stable protein from differ-

ent species was not noticeably different using isoelectrofocusing (Jones, S. J., and Mortimer, R. H. (1985). Species identification of cooked meats by isoelectrofocusing: preliminary studies to resolve heat-stable components isolated from adrenal and muscle tissue. In: *Biochemical Identification of Meat Species*, Patterson, R. L. S. (Ed.), p. 118–128. Elsevier Science Publishing, Inc., New York). Sherikar and coworkers reported that "troponin T", with a molecular weight of 36 kD, is the species-specific antigenic fraction of TSMPs (Sherikar, A. T., Karkare, U. D., Khot, J. B., Jayarao, B. M., and Bhilegaonkar, K. N. (1993) *Meat Sci.* 33:121–136). The present results did not agree on the identity of the species-specific TSMP, but did confirm the existence of this protein in muscle tissues. The production of MAb does not require a pure protein as an immunogen. MAbs to the species-specific components in partially purified muscle proteins can be selected by appropriate screening procedures (Garcia, T., Martin, R., Moreales, P., Haza, A.I., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B., and Hernandez, P. E. (1994) *J. Sci. Food Agric.* 66:411–415). In the present case, the occurrence of all four MAbs from different hybridoma cell lines coincidentally recognizing the same proteins indicated that the TSMP of 24 kD may be the only species-specific component present in the cooked pork extract.

Detection of Pork Adulteration

All four MAbs developed in this work exhibit several similar characteristics. MAb 5H9 with potentially higher affinity than others was chosen for the subsequent analysis. The optimal condition for ELISA was determined by checkerboard titrations. The highest sensitivity of assay was achieved using 2 µg/well of proteins from meat extracts and 1:102,400 dilution of ascitic fluid and 1:2,500 dilution of goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate. The developed ELISA successfully detected adulteration of pork in raw and cooked meat mixtures. The detection limit of the assay, defined as two standard deviation apart from mean reading of the heterogenous meat matrix containing no pork, was 10 g/kg of pork in heterogenous meat mixtures which is adequate in determination of low level of adulteration of pork in meat products. The curvilinear relations of second-degree polynomial with high correlation coefficient ($r^2 > 0.995$) between pork contents and ELISA responses can serve as standard curves for quantifying pork in beef (7.6) and pork in turkey (Table 9) for both raw and cooked status.

TABLE 6

Detection of Pork in Beef by ELISA
Confidence limits for mean values of different percentages
of pork in beef

% pork in beef	mean OD* (405 nm)	Lower 99%	Upper 99%
0	.012	.010	.014
1	.059	.056	.062
2	.150	.120	.180
4	.219	.192	.246
8	.317	.281	.353

*mean of 5 replicates

TABLE 7

Detection of Pork in Turkey by ELISA Confidence limits for mean values of different percentages of pork in turkey			
% pork in turkey	mean OD* (405 nm)	Lower 99%	Upper 99%
0	.004	.003	.005
1	.024	.020	.028
2	.041	.036	.046
4	.141	.125	.157
8	.282	.247	.317

*mean of 5 replicates

For raw meat speciation, serum proteins were used exclusively as antigens in developing immunoassays (Ayob, M. K., Ragab, A. A., Allen, H. C., Farag, R. S., and Smith, C. J. (1989) *J. Sci. Food Agric.* 49:103-116; Jones, S. J., and Patterson, R. L. S. (1986). A modified indirect ELISA procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilized immunoreagents. *J. Sci. Food Agric.* 37:767-775; Patterson, R. M., Whittaker, R. G., and Spencer, T. L. (1984) *J. Sci. Food Agric.* 35:1018-1023; Whittaker, R. G., Spencer, T. L., and Copland, J. W. (1983) *J. Sci. Food Agric.*, 34:1143-1148). However, the presence of serum protein is not necessarily correlated to the presence of the muscle tissue, the quantitative aspect of these assay is not reliable (Griffiths, N. M., and Billington, M. J. (1984) *J. Sci. Food Agric.* 35:909-914). Moreover, serum proteins are denatured under the cooking practice; the use of serum proteins for cooked meat identification is merely impossible. Assays based on detection of muscle proteins is more indicative for quantifying the presence of extraneous muscle tissue in meat mixtures. The use of insoluble myofibrillar proteins, such as desmin, as antigen increases the complexity of extraction procedures (Billett, E. E., Bevan, R., Sanlon, B., Pickering, K., and Gibbons, B. (1996) *J. Sci. Food Agric.* 70:396-404). The developed assay requires only a simple saline extraction which will reduce time and labor for sample extraction and facilitate analysis in large-scale screening tests.

All publications and patent applications mentioned in the specification are indicative of the level of skill of those skilled in the art to which this invention pertains. All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publi-

cation or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be obvious that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims.

What is claimed is:

1. A monoclonal antibody capable of identifying raw and cooked pork, wherein said monoclonal antibody recognizes thermal-stable protein of pork, wherein said monoclonal antibody is capable of binding to said thermal-stable protein in pork that has reached an internal temperature of 71.1° C.
- 10 2. A monoclonal antibody capable of identifying raw and cooked pork, wherein said cooked pork is heated to a temperature of up to 100° C.
- 15 3. The monoclonal antibody of claim 2, wherein said cooked pork is heated at a temperature of up to 100° C., for up to 20 minutes or longer.
- 20 4. The monoclonal antibody of claim 2, wherein said cooked pork is heated at a temperature of up to 100° C., for up to 20 minutes.
5. A monoclonal antibody having the binding specificity of monoclonal antibody 5H9.
- 25 6. A monoclonal antibody having the binding specificity of the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited as ATCC No. HB-12245.
7. A monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited as ATCC No. HB-12245.
- 30 8. The monoclonal antibody of claim 1, wherein said antibody is of the IgG class.
9. The monoclonal antibody of claim 4, wherein said antibody is of the IgG class.
10. The monoclonal antibody of claim 5, wherein said antibody is of the IgG class.
- 35 11. A kit comprising a monoclonal antibody capable of identifying raw and cooked pork in a sample, wherein said cooked pork is heated to a temperature of up to 100° C.
12. A kit comprising a monoclonal antibody having specificity of 5H9.
- 40 13. A kit comprising a monoclonal antibody having the binding specificity of the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited as ATCC No. HB-12245.
14. A kit comprising a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited as ATCC No. HB-12245.

* * * * *



US 20040152131A1

(19) **United States**

(12) **Patent Application Publication** (10) **Pub. No.: US 2004/0152131 A1**
Hsieh (43) **Pub. Date:** **Aug. 5, 2004**

(54) **METHODS FOR END POINT
TEMPERATURE TESTING**

(75) Inventor: **Y.H. Peggy Hsieh**, Auburn, AL (US)

Correspondence Address:
ALSTON & BIRD LLP
BANK OF AMERICA PLAZA
101 SOUTH TRYON STREET, SUITE 4000
CHARLOTTE, NC 28280-4000 (US)

(73) Assignee: **Auburn University**, Auburn, AL

(21) Appl. No.: **10/742,533**

(22) Filed: **Dec. 19, 2003**

Related U.S. Application Data

(60) Division of application No. 09/963,986, filed on Sep. 26, 2001, now Pat. No. 6,692,930, which is a con-

tinuation of application No. 09/225,141, filed on Jan. 4, 1999, now Pat. No. 6,423,506, which is a division of application No. 08/906,851, filed on Aug. 6, 1997, now Pat. No. 6,288,215.

(60) Provisional application No. 60/024,887, filed on Aug. 30, 1996.

Publication Classification

(51) **Int. Cl.⁷** **G01N 33/53**

(52) **U.S. Cl.** **435/7.1**

(57) **ABSTRACT**

Monoclonal antibodies are provided which bind to heat-treated proteins of meats. The antibodies are useful in detecting the presence of an exogenous meat in a cooked or raw meat sample. Furthermore, the antibodies can be used to determine the end point temperature of a meat sample.

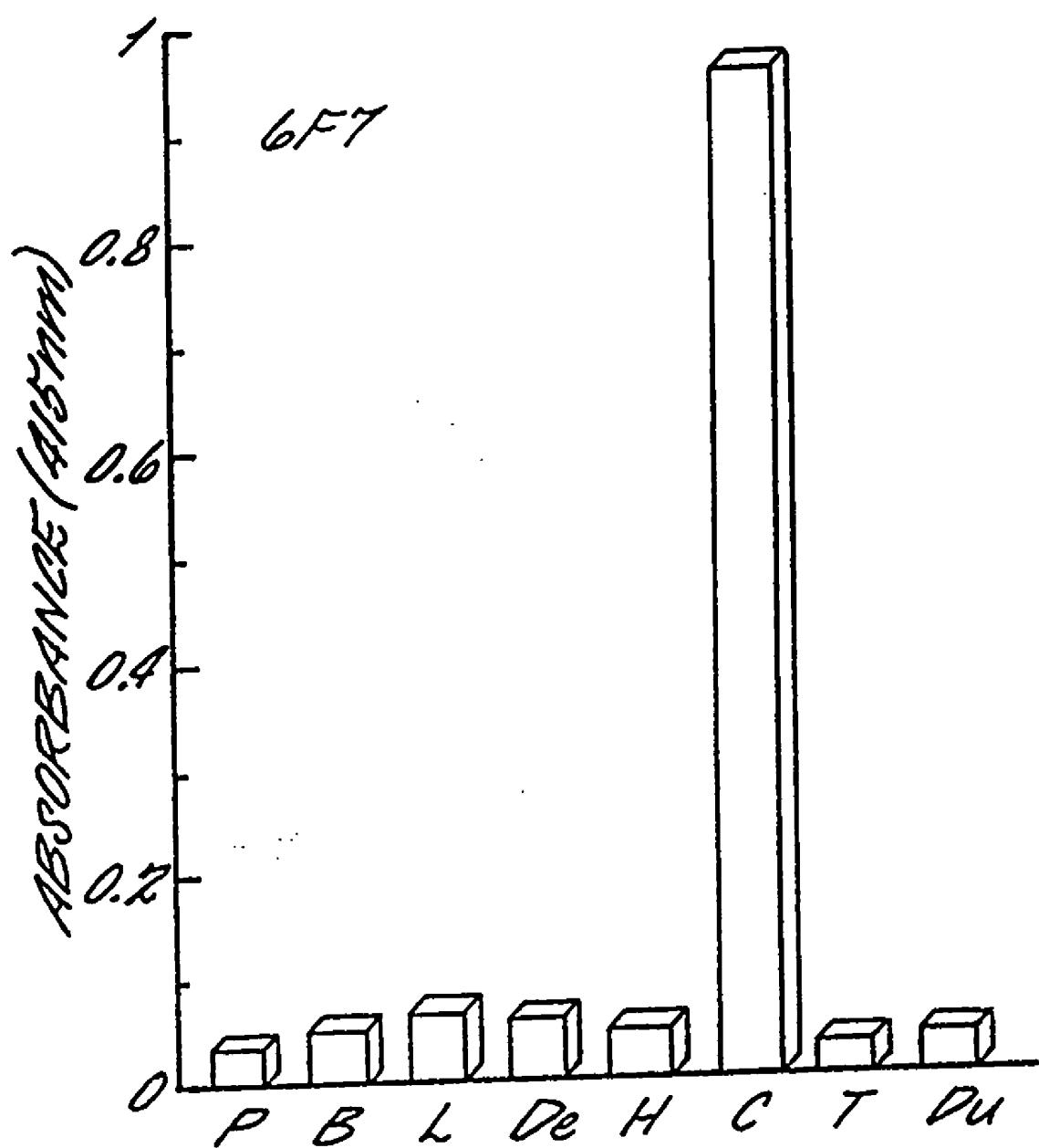
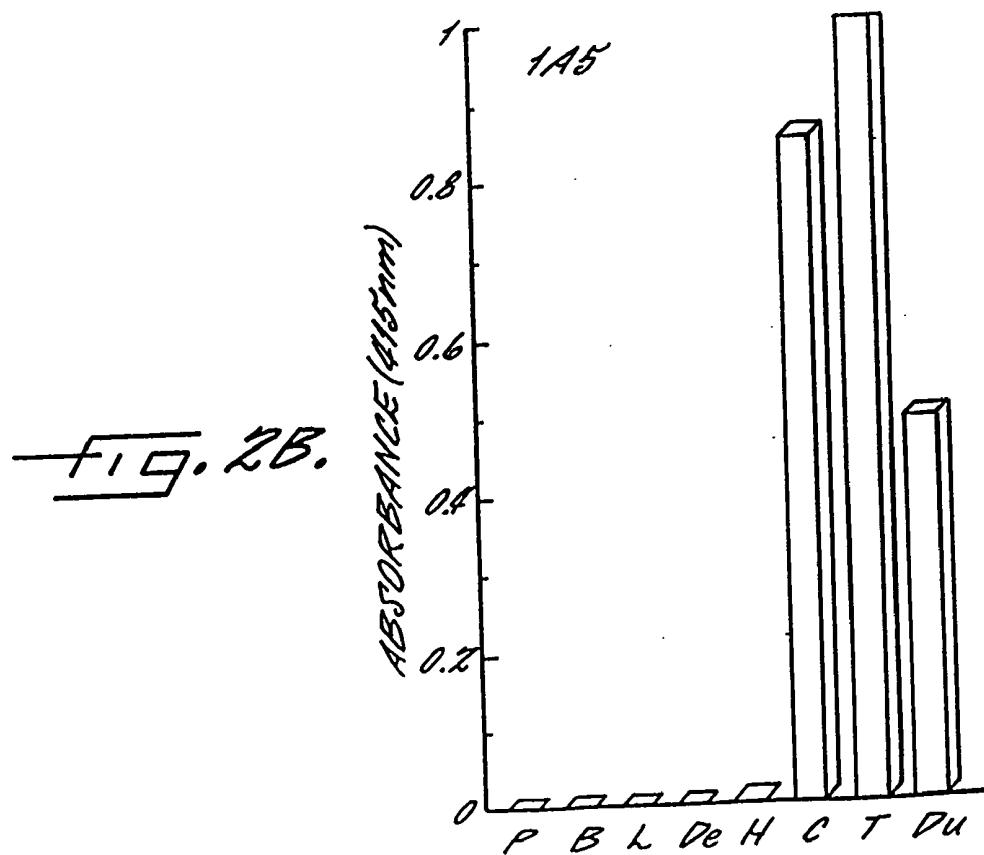
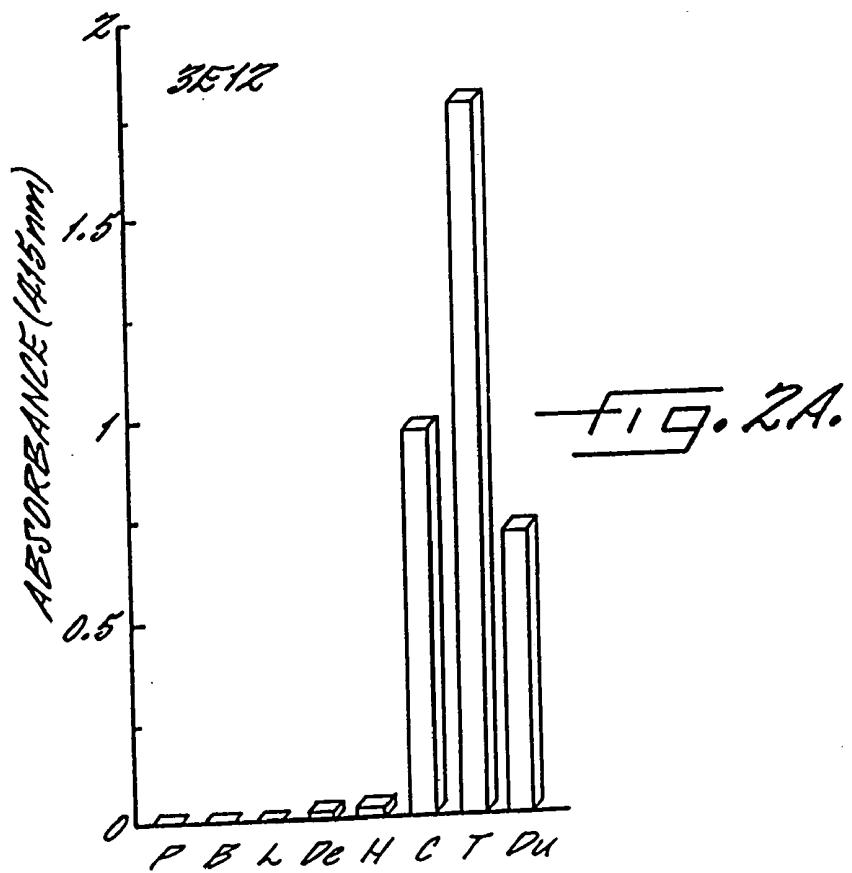
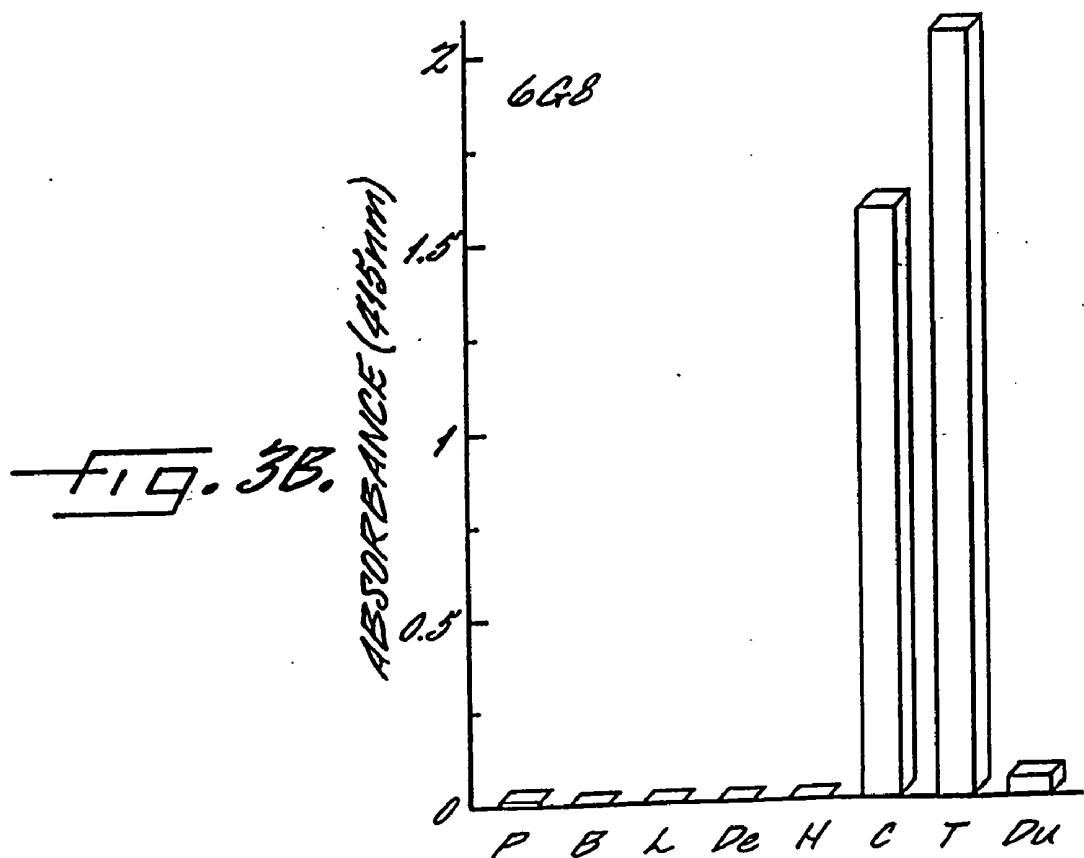
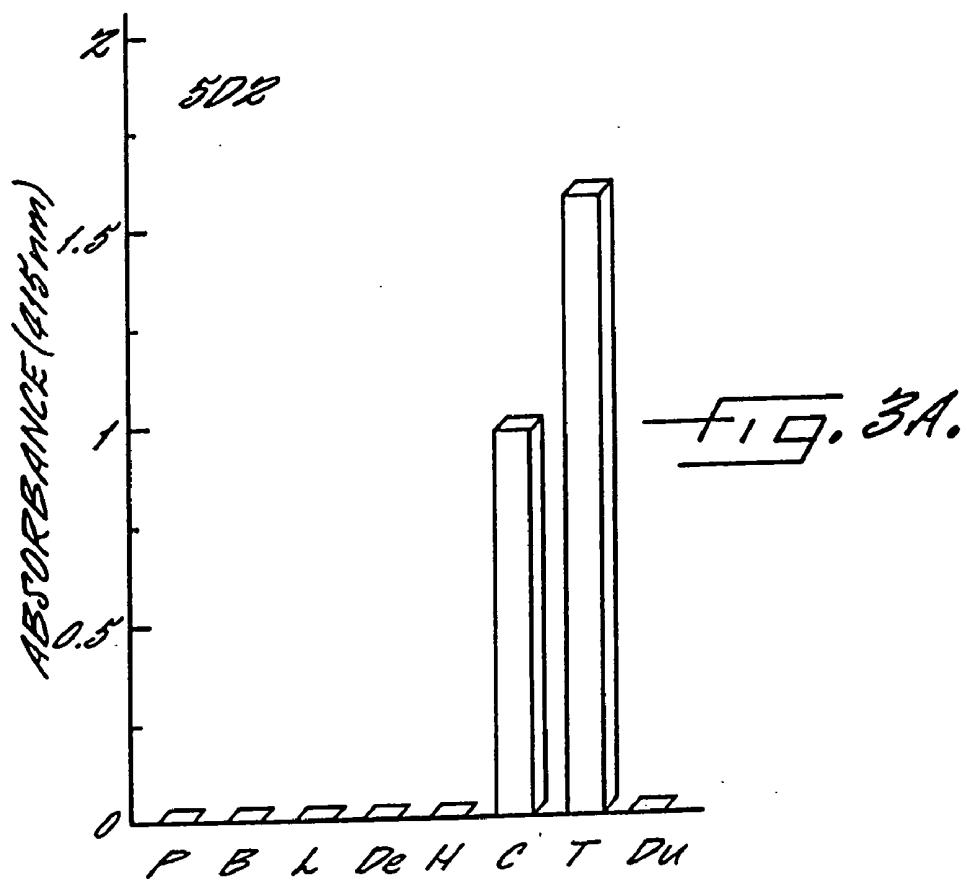
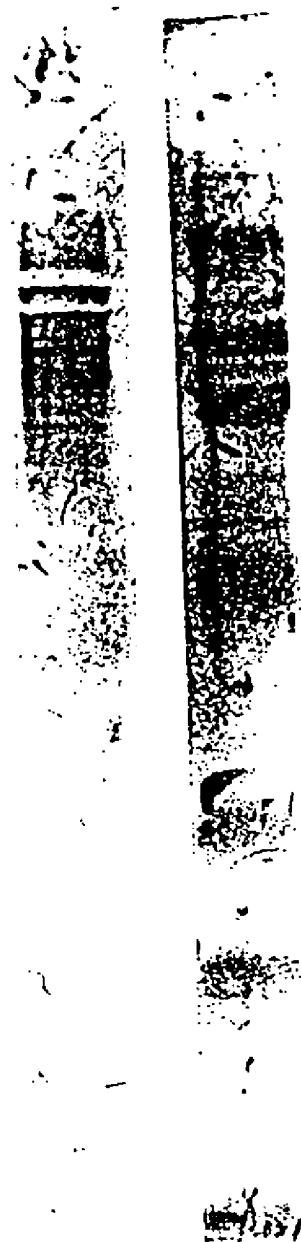


FIG. 1.





1 2



-205K
-116.5K
-80K

-49.5K

-32.5K

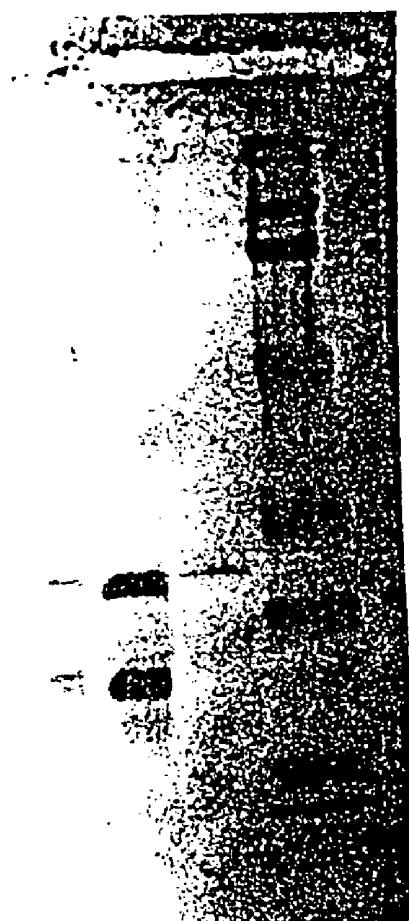
-27.5K

-18.5K

FIG.4

1 2 3 4

5 6 7 8



-205K
-116.5K
-80K
-49.5K

-32.5K
-27.5K

-18.5K

FIG.5

1 2 3 4 5

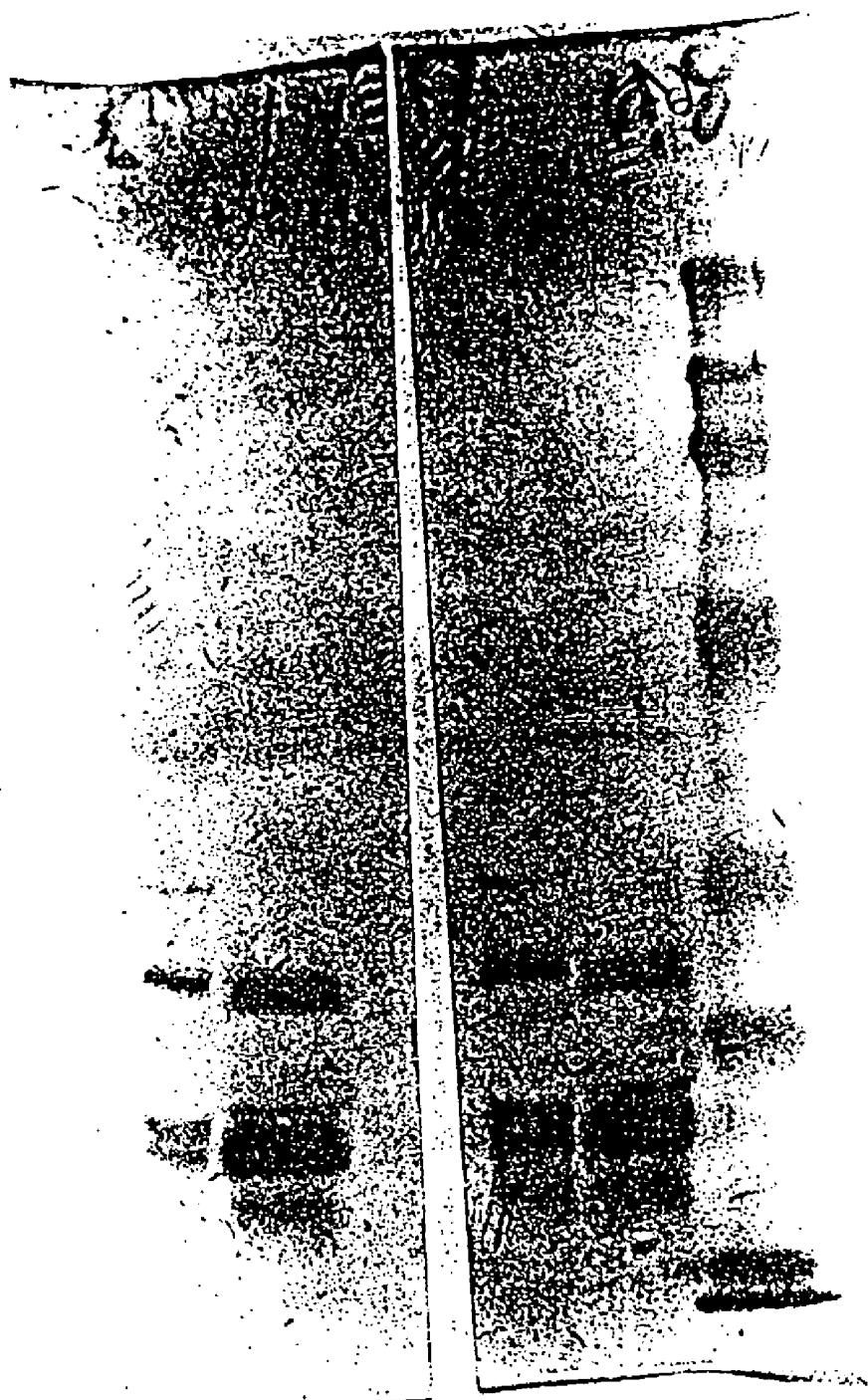


FIG. 6

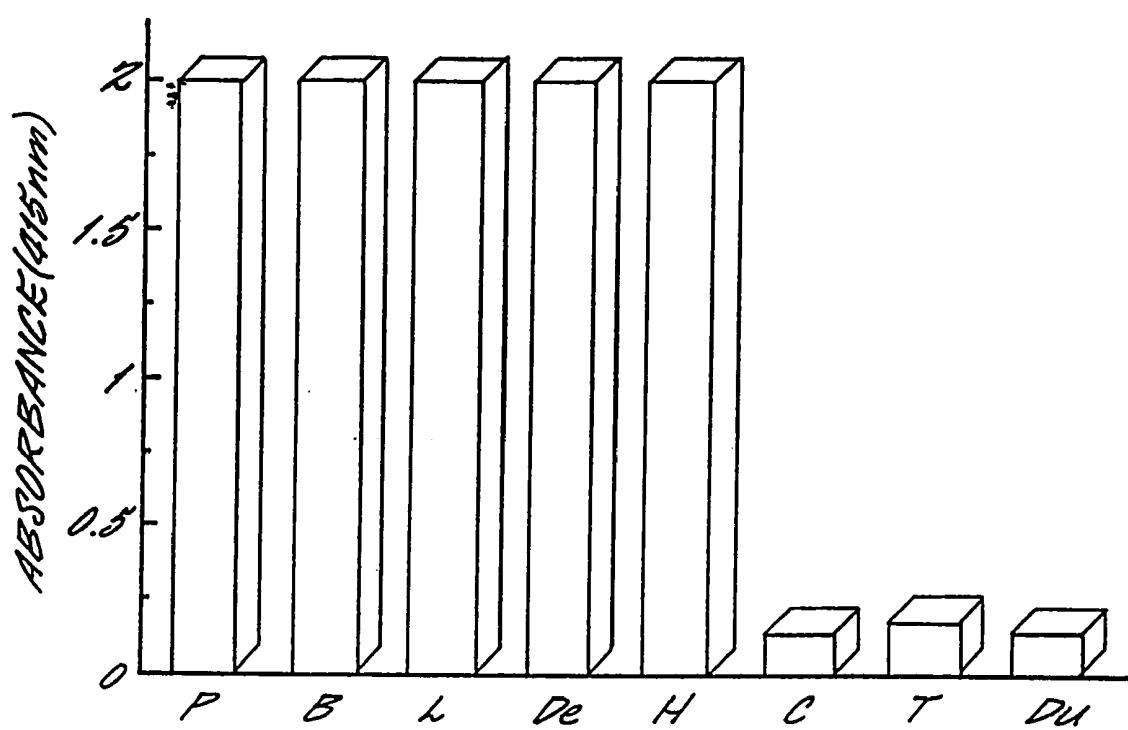


fig. 7.

1 2 3 4 5 6

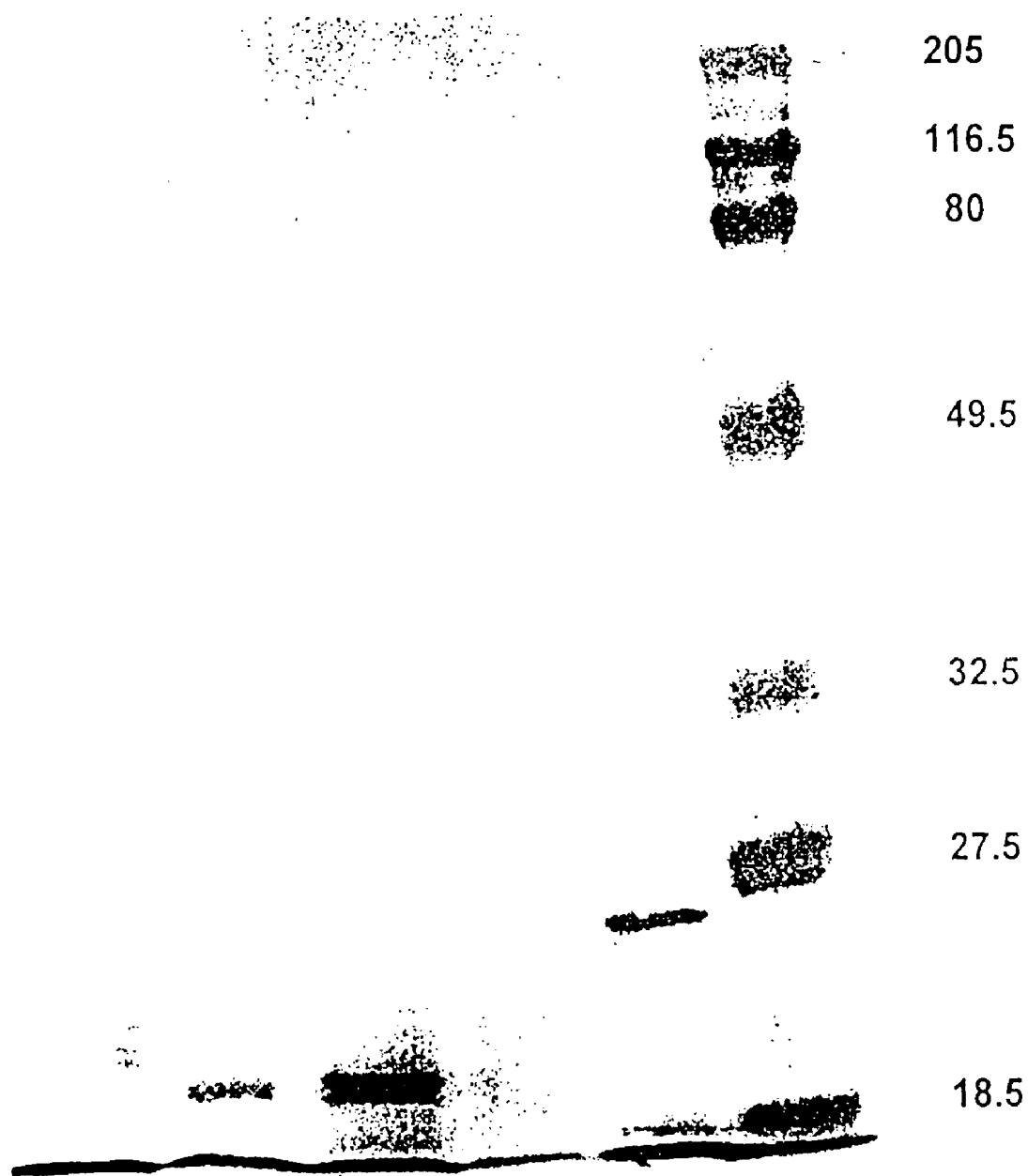


FIG.8

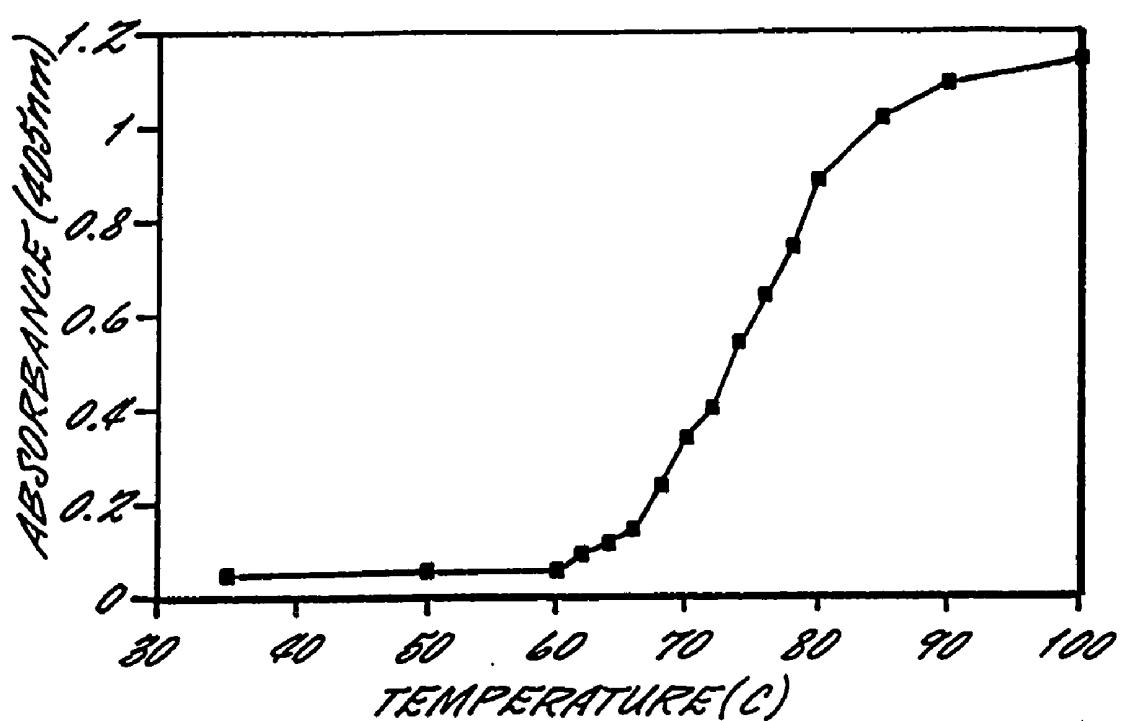


FIG. 9.

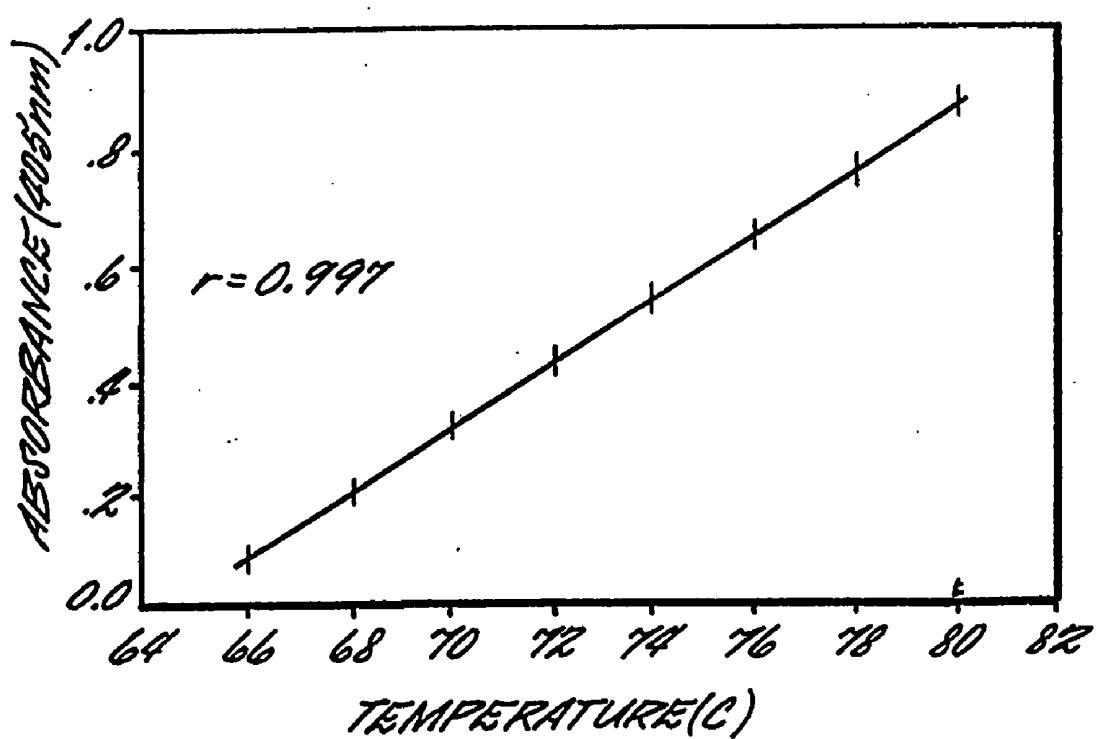


FIG. 10.

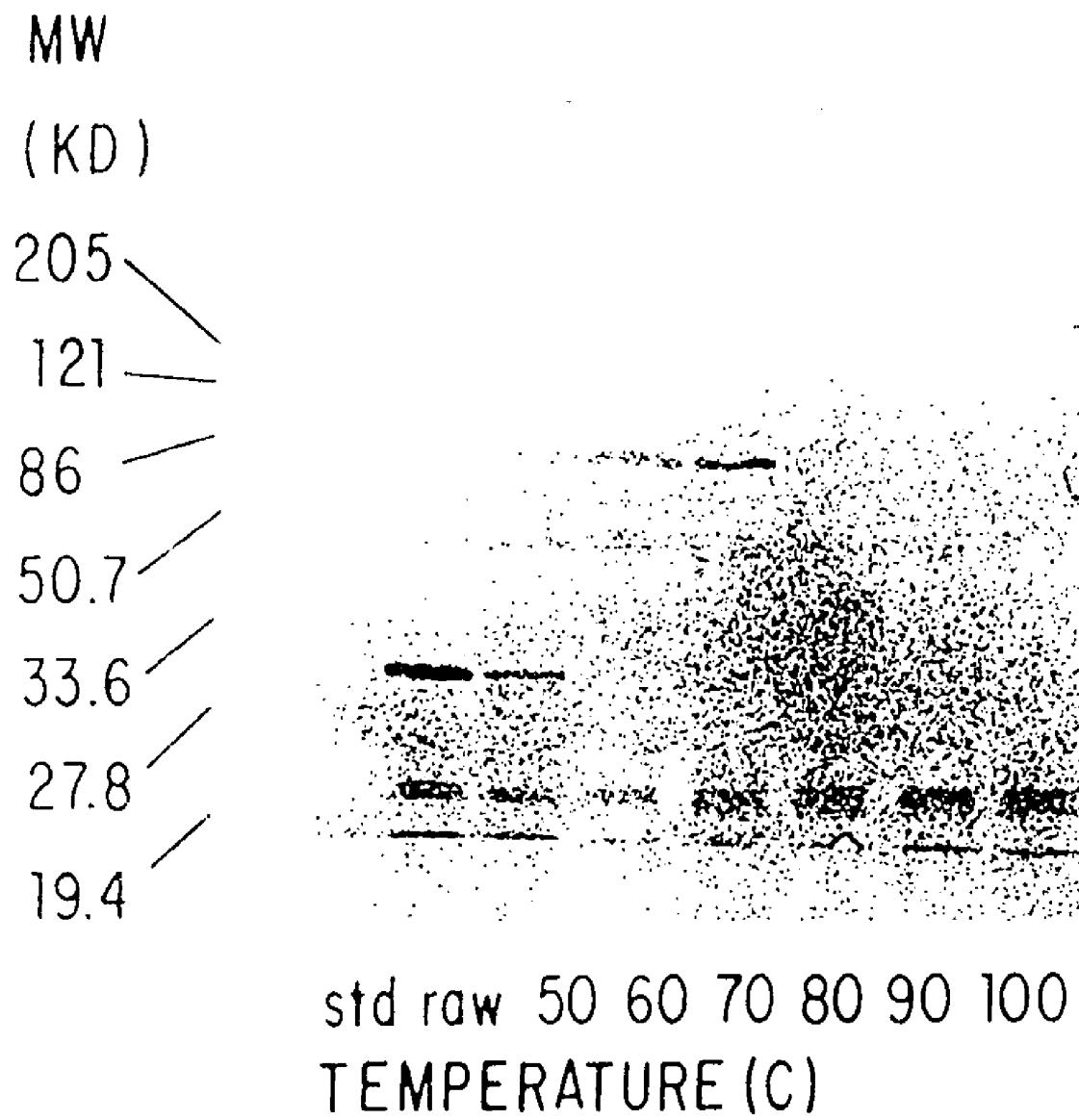


FIG. 11

SPECIFICITY OF MAB 549
ELISA RESPONSES OF DIFFERENT MEAT SPECIES

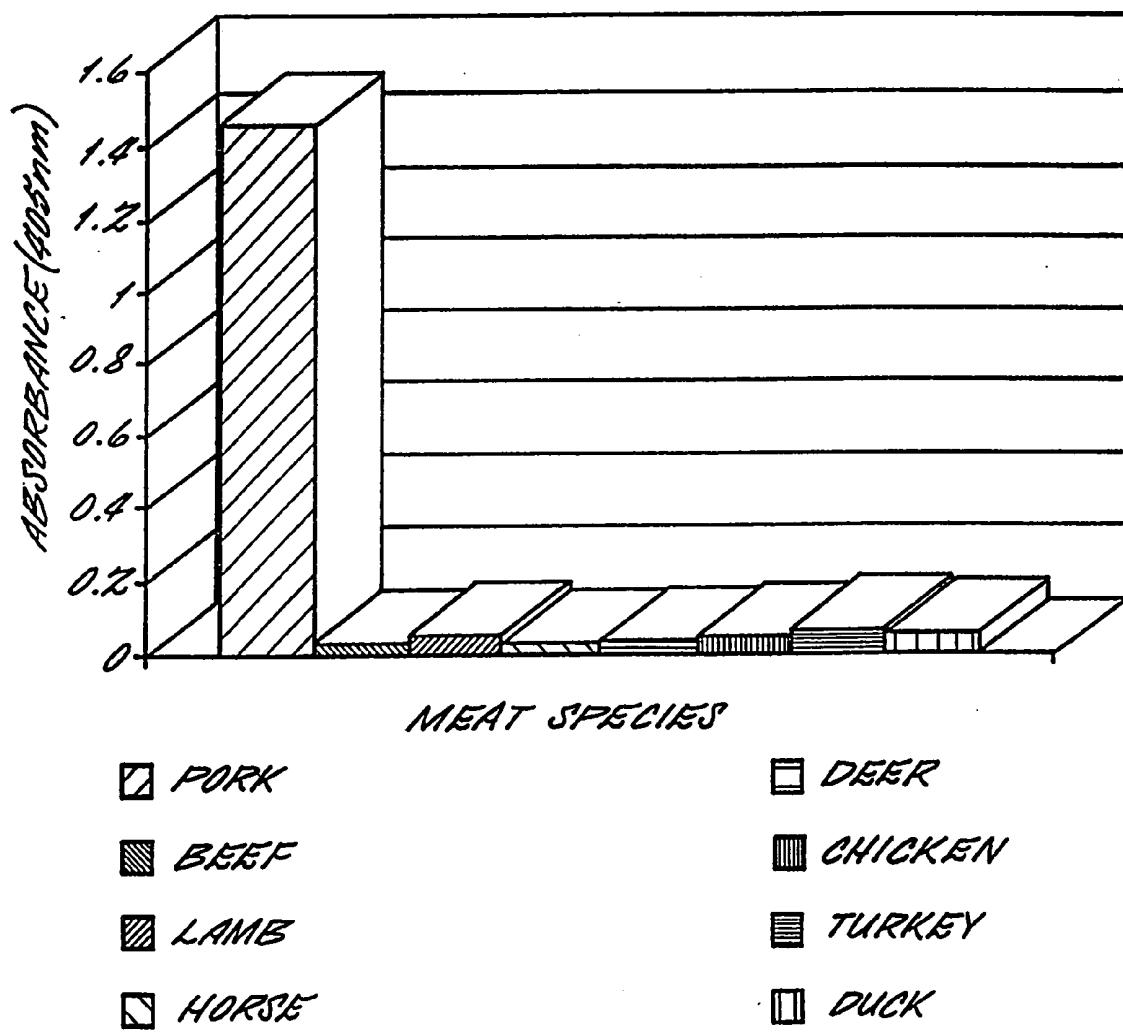


FIG. 12.

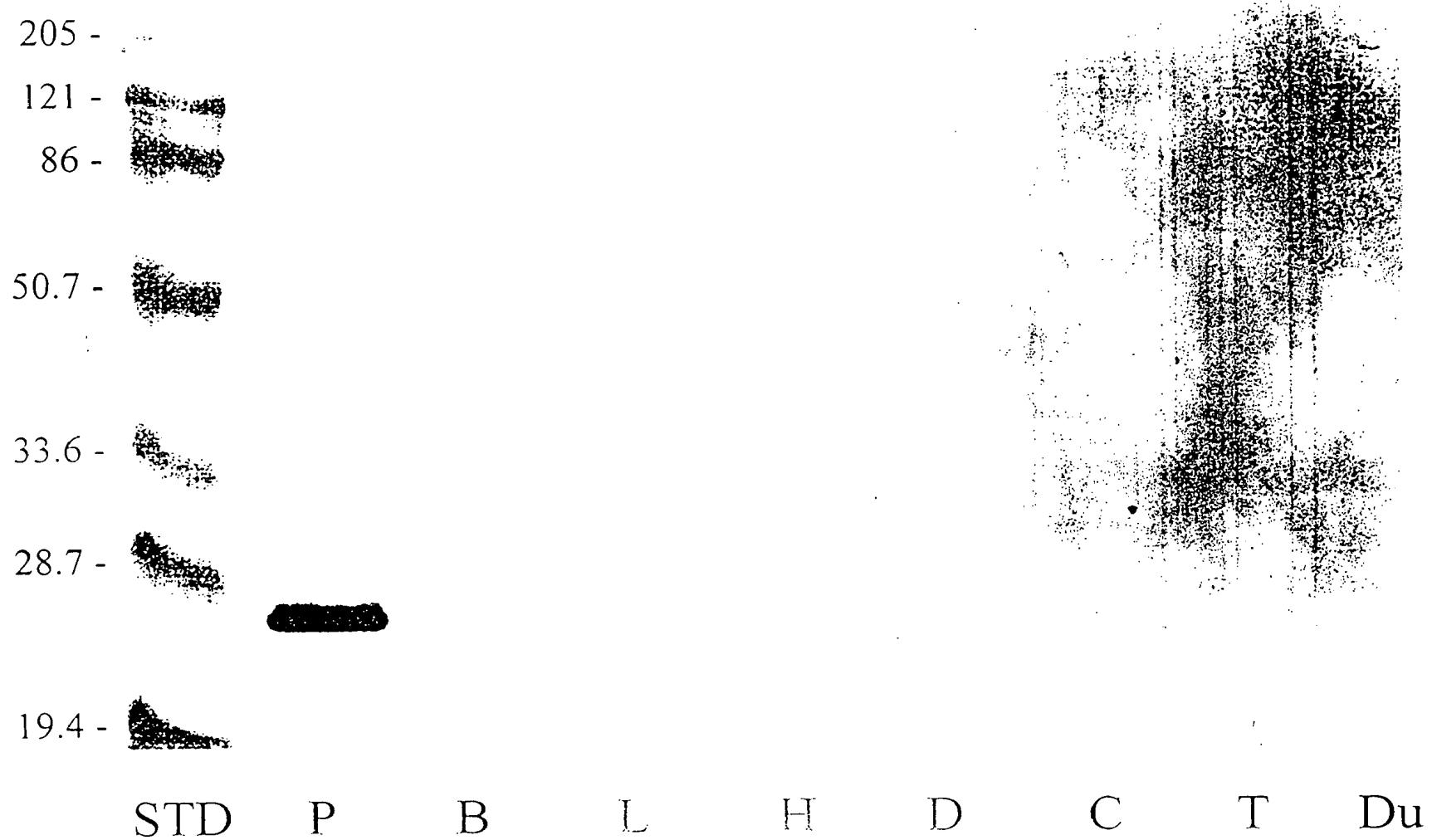


FIG. 13

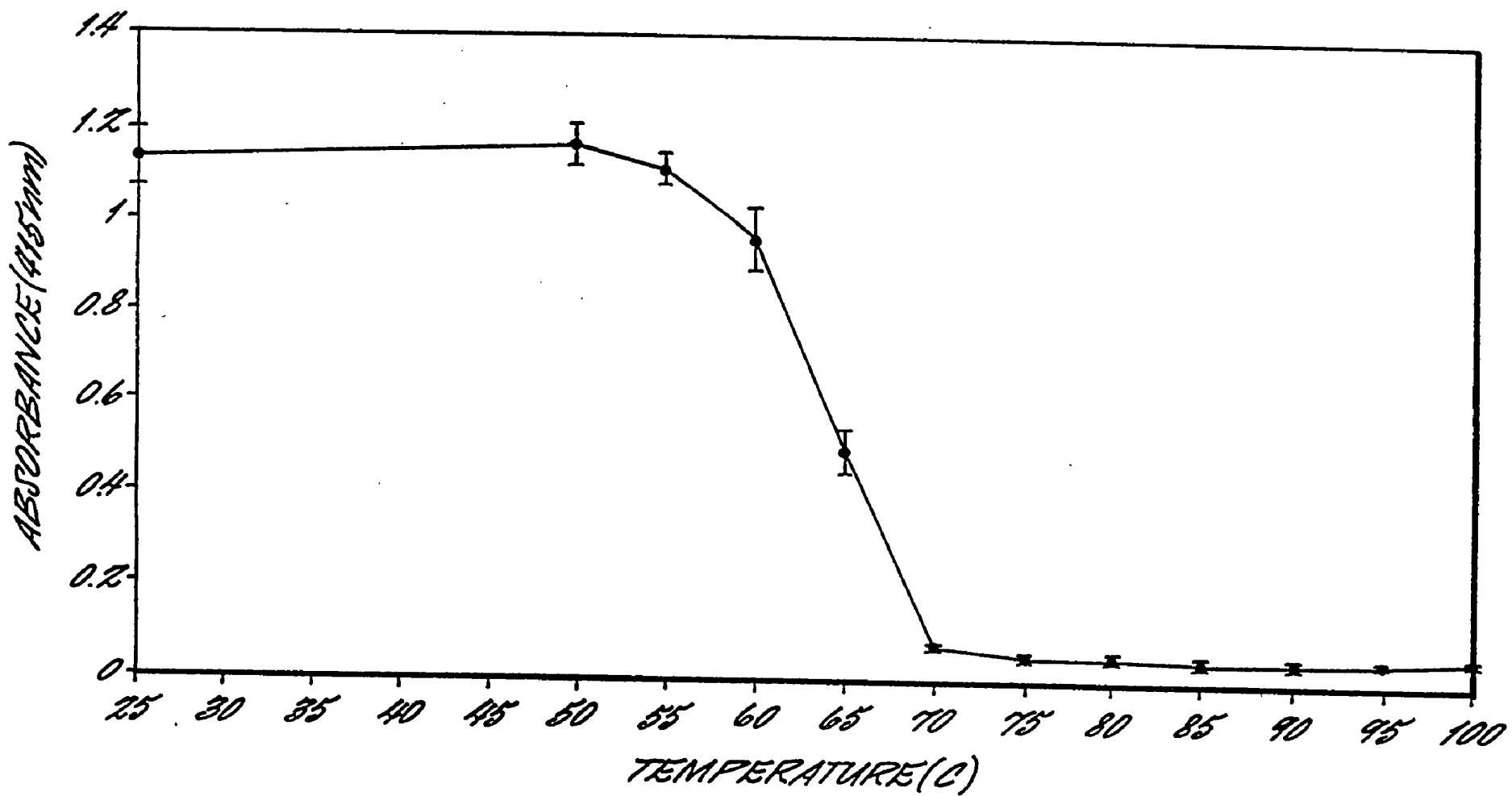


FIG. 1A.

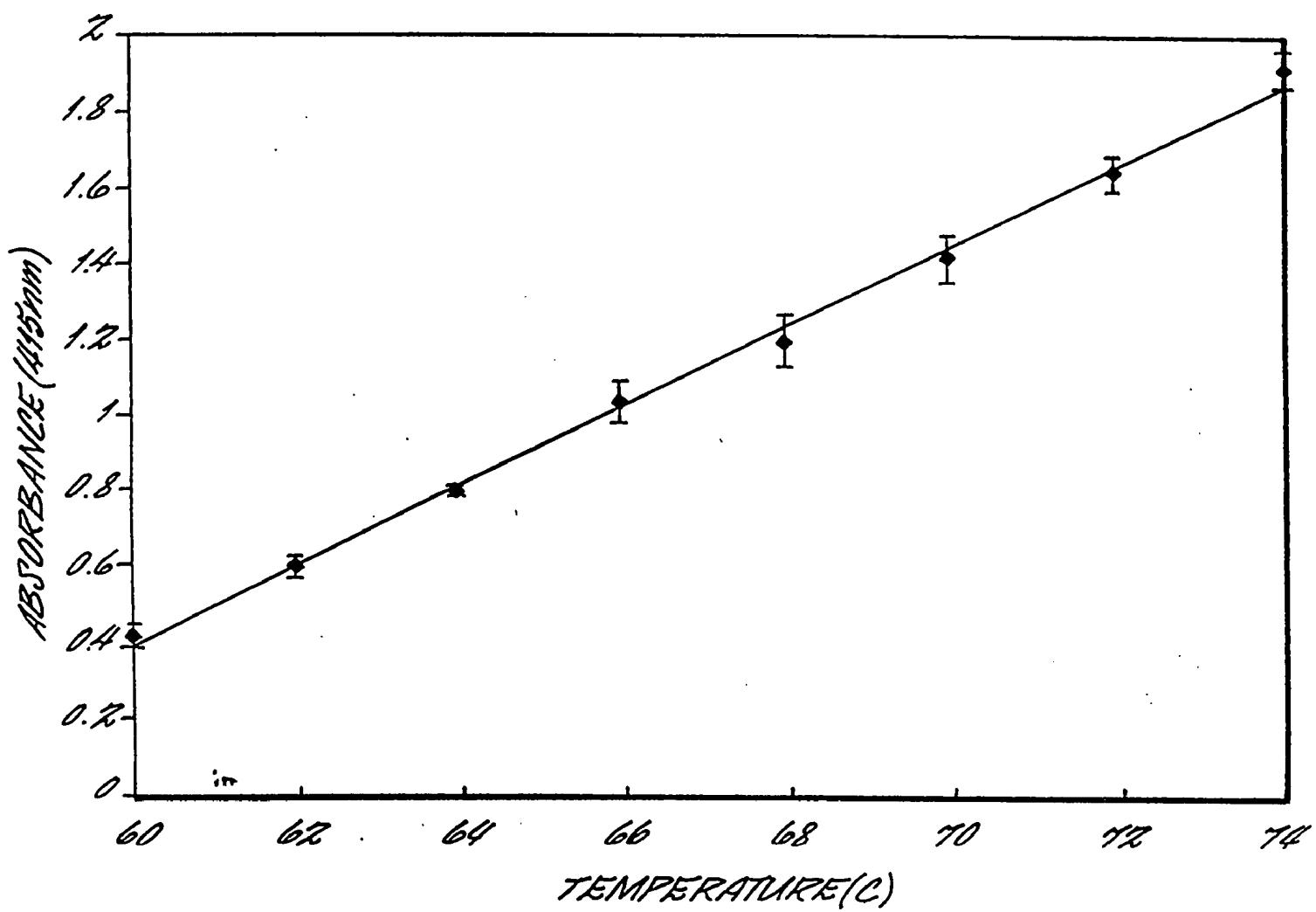


FIG. 15.

METHODS FOR END POINT TEMPERATURE TESTING

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application is a divisional of U.S. Continuation application Ser. No. 09/963,986, filed Sep. 26, 2001, which claims the benefit of U.S. Divisional application Ser. No. 09/225,141, filed Jan. 4, 1999, which claims the benefit of U.S. Utility application Ser. No. 08/906,851, filed Aug. 6, 1997, which claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/024,887, filed Aug. 30, 1996, all of which are hereby incorporated herein in their entirety by reference.

FIELD OF THE INVENTION

[0002] The present invention relates to the development of monoclonal antibodies for the detection of meat species, particularly cooked meats, and for the end-point temperature of heat processed meat.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] The accurate labeling of meat products is mandated and monitored by the United States Department of Agriculture (USDA) as well as by state and local governments. Mixing undeclared species in meat products is illegal under Food Labeling Regulations. Apart from regulatory reasons, the prevention of adulteration of meat products with less desirable meat species is important to the consumers for economic, health, food safety and religious reasons.

[0004] Several methods have been developed to identify meat species including electrophoresis, chromatography, DNA hybridization, and immunoassays. Immunological techniques, including agar-gel immunodiffusion (AGID) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are most commonly applied for meat species identification.

[0005] There are several disadvantages to the official method AGID. Concentrated antiserum preparations are required to obtain visible precipitin lines in AGID. Obtaining the antiserum is expensive in large-scale testing. Furthermore, the sensitivity of AGID is variable. Usually ten percent or more contamination must be present to detect adulteration with this method. Lastly, AGID cannot be used for species identification in cooked meat because of the shortage of commercial antiserum specific to cooked meats.

[0006] The ELISA method has emerged as a sensitive, rapid, and specific method for meat speciation. This method can detect levels as low as one percent or less of meat contamination. Furthermore, it requires only simple sample preparation and no expensive equipment or highly skilled operator. In addition, the ELISA technique can be used for both qualitative and quantitative analysis of meat proteins.

[0007] Specific antibodies, either polyclonal antibodies or monoclonal antibodies (MAbs), are required as capture reagents in ELISA. Most of the ELISA methods currently employed for meat species identification use polyclonal antibodies as a capture reagent. However, polyclonal antibodies have disadvantages such as limited production, variable affinity and a requirement for further purification to eliminate cross-reaction.

[0008] Using monoclonal antibody based ELISA can provide better data quality and eventually reduce the cost of

assays. To date, the monoclonal antibodies which are utilized in ELISA based assays for meat identification have been raised against native proteins. The antibodies are useful for the detection of meat in raw meat mixtures.

[0009] A few disclosures of the production of polyclonal antibodies for the qualitative detection of meat species in cooked meat samples has been reported. These polyclonal antibodies have been raised against native heat-resistant immunizing antigens.

[0010] Wide spread meat species adulteration has been found particularly among heat-processed meat products and retail meat markets. Hsieh et al. (1995) Jnl. of Food Quality 19:1-13, indicated that the violation rate in cooked products was higher than raw meats (22.9% versus 15.9%) in the domestic market. This adulteration can have serious health consequences. Poultry carries pathogens that cause food-borne diseases. Cooking poultry requires a minimum internal temperature of 71.1° C. (160° F.) to kill salmonella. Beef requires a minimum internal temperature of 68.3° C. (155° F.) to kill *E. Coli* H7:0157. If a meat product like beef is contaminated with poultry meat, it might impose a potential health hazard due to the inadequate heat-processing even at a very low level of contamination.

[0011] Development of a suitable screening method to detect undeclared exogenous meat is important to comply with the food labeling regulation. Furthermore, a means for determining the adequate end-point cooking temperature for food safety is also important.

[0012] There is, therefore, needed a method for the determination of species identification in cooked meats as well as to determine the end-point cooking temperature of meats.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0013] The present invention is drawn to antibodies, monoclonal antibodies or fragments thereof which bind to soluble heat-denatured, heat degraded meat proteins, or thermal-stable muscle protein as well as to methods for making such antibodies and their uses. The antibodies are capable of meat species identification in raw and cooked meats and thus, find use in the detection of species substitution in meats. Additionally, the monoclonal antibodies that react to heat-denatured proteins are useful as an indicator of end-point temperature for cooked meats. Kits containing the antibodies are also provided.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0014] FIG. 1 The specificity of MAb 6F7 to cooked meat determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings. P: pork; B: beef; L: Lamb, De: deer; H: horse; C: chicken; T: turkey; Du: duck.

[0015] FIG. 2 The specificity of MAbs 3E12 and 1A5 to cooked meat determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings. P: pork; B: beef; L: lamb, De: deer; H: horse; C: chicken; T: turkey, Du: duck.

[0016] FIG. 3 The specificity of MAbs 5D2 and 6G8 to cooked meat determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings. P: pork; B: beef; L: Lamb, De: deer; H: horse; C: chicken; T: turkey, Du: duck.

[0017] FIG. 4 Immunoblots of proteins extracted from cooked chicken separated on 12% (w/v) SDS-PAGE. Lanes; 1=reacted with 6F7, 2= prestained molecular weight standard.

[0018] **FIG. 5** Immunoblots of proteins extracted from cooked chicken, turkey and duck separated on 12% (w/v) SDS-PAGE. Lanes; 1 and 5=chicken, 2 and 6=turkey, 3 and 7=duck, 4 and 8=molecular weight standard. Lanes 1 to 4 were reacted with MAb 3E12. Lanes 5 to 8 were reacted with MAb 1A5.

[0019] **FIG. 6** Immunoblots proteins extracted from cooked chicken and turkey separated on 12% (w/v) SDS-PAGE. Lanes; 1 and 3=chicken, 2 and 4=turkey, 5=molecular weight standard. Lanes 1 and 2 were reacted with MAb 5D2. Lane 3 and 4 were reacted with MAb 6G8.

[0020] **FIG. 7** The specificity of MAb 2F8 to cooked meat determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings. P: pork; B: beef; L: Lamb; De: deer; H: horse; C: chicken; T: turkey; Du: duck.

[0021] **FIG. 8** Immunoblots of proteins extracted from five cooked mammalian meats separated on 12% (w/v) SDS-PAGE reacted with MAb 2F8. Lanes; 1=pork, 2=beef, 3=Lamb, 4=deer, 5=horse, 6=Molecular weight standard.

[0022] **FIG. 9** Indirect ELISA responses of MAb 2F8 to protein extracts from beef cooked to different end point temperature (EPT). (Values are the mean of eight replications).

[0023] **FIG. 10** Linear regression of indirect ELISA response and EPT of cooked beef using MAb 2F8. (Correlation coefficient was determined by eight replicate values).

[0024] **FIG. 11** Western blot of muscle extracts from beef cooked to different EPT. MAb 2F8 was used as probing agent.

[0025] **FIG. 12** The specificity of MAb 5H9 determined by indirect ELISA. Data shown are the means of three readings.

[0026] **FIG. 13A** representative SDS-PAGE and Western blot showing the antigenic components in raw and cooked pork using MAb 5H9.

[0027] **FIG. 14** Representative Western blot showing antigenic components of cooked meat soluble proteins extracted from five mammalian animal meats, pork (P), beef (B), lamb (L), deer (D), and horse (H). Protein extracts were separated on 12% (wt/vol) SDS-PAGE. Undiluted supernatant of MAb 2F8 was used as primary antibody to probe the proteins.

[0028] **FIG. 15** Indirect competitive ELISA response of MAb 5D2 to protein extract from chicken breast cooked to different end-point temperature (EPT).

[0029] **FIG. 16** Indirect ELISA response of MAb 5D2 to protein extract from chicken breast cooked to different end-point temperature (EPT).

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

[0030] Antibodies and monoclonal antibodies, including fragments thereof which are capable of binding with the specificity of the antibody or monoclonal antibody, to soluble heat-denatured or heat degraded meat proteins are provided. Additionally, antibodies and monoclonal antibodies to thermal-stable muscle protein are provided. Such antibodies specifically bind to soluble heat-denatured or heat

degraded proteins as well as to thermal-stable muscle proteins from meat and are capable of identifying particular meat types or meat species.

[0031] The antibodies of the invention include polyclonal and monoclonal antibodies as well as fragments thereof which retain the ability to bind to the heat-treated proteins from meat. Heat-treated proteins include heat degraded, heat-denatured soluble proteins as well as to thermal-stable muscle proteins from meat. An antibody, monoclonal antibody, or fragment thereof is said to be capable of binding to a molecule if it is capable of specifically reacting with the molecule to thereby bind the molecule to the antibody, monoclonal antibody, or fragment thereof. The term "antibody" (Ab) or "monoclonal antibody" (Mab) is meant to include intact molecules as well as fragments or binding regions or domains thereof (such as, for example, Fab and F(ab)_n fragments) which are capable of binding antigen. Such fragments are typically produced by proteolytic cleavage, such as papain or pepsin. Alternatively, antigen-binding fragments can be produced through the application of recombinant DNA technology or through synthetic chemistry.

[0032] Methods for the preparation of the antibodies of the present invention are generally known in the art. For example, see *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed. Harlow & David Lane (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1988), as well as the references cited therein. Standard reference works setting forth the general principles of immunology include: Klein, J. *Immunology: The Science of Cell-Noncell Discrimination*, John Wiley & Sons, N.Y. (1982); Dennett, R. et al. *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Press, N.Y. (1980); and Campbell, A. "Monoclonal Antibody Technology," *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology*, Vol. 13, Burdon et al. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1984). See also, U.S. Pat. Nos. 4,609,893; 4,713,325; 4,714,681; 4,716,111; 4,716,117; and 4,720,459.

[0033] The antibody and monoclonal antibodies of the present invention can be prepared by various methods. One method to obtain antibodies to heat-degraded or heat-denatured proteins utilizes heat-treated (100° C., 15 min.) soluble meat proteins as antigen. Such soluble proteins can be prepared by blending a sample of meat from a species of interest, adding a solution, generally saline to the blended meat, followed by heating, e.g. boiling, the homogenate. The soluble proteins are then extracted by gentle agitation followed by centrifugation and filtration. The supernatant contains the protein extract which can be used to immunize mice.

[0034] Another antibody preparation method utilizes thermal-stable muscle protein as antigen. Such thermal-stable proteins can be prepared by modifying the method of Milgrom and Witebsky (1962), *Immunology* 5:46-66, herein incorporated by reference. Generally, after removing fat and connective tissue, muscle tissue is homogenized, sonicated and heated to boiling. The mixture is centrifuged; the supernatant collected, autoclaved, and filtered to remove debris and proteins precipitated by using, for example, ethanol. The precipitate is dried and can be used to immunize an animal, i.e., mice, for the production of antibodies.

[0035] A critical aspect of the invention involves the selection of antibodies or monoclonal antibodies made by

the above method by indirect ELISA. In performing the indirect ELISA assays, the soluble protein antigen is bound to a polyvinyl surface. The polyvinyl surface is capable of binding the heat-treated soluble meat (denatured or degraded) proteins better than other materials tested, such as polyethylene plates. Until the present invention, this had not been recognized in the prior art resulting in false negative readings for antibody production.

[0036] By the method of the invention described herein, monoclonal antibodies having a desired specificity can be selected. Thus, monoclonal antibodies specific for a particular meat species or for a type or class of meats can be produced.

[0037] By meat type or class is intended a broader class of meats including several meat species. Thus, type or class refers to mammalian, poultry, and the like. By meat or meat species is generally intended meats which are commonly used for consumption, including poultry such as chicken, turkey, and duck, and mammalian meats, such as pork, beef, lamb, deer, and horse. Thus, particular meat species include but are not limited to chicken, turkey, duck, pork, beef, lamb, deer, horse, and the like. It is recognized that the method of the invention could be utilized to obtain antibodies against any meat species.

[0038] The methods of the invention can be used to develop antibodies which are capable of identifying classes of meats, for example, mammalian versus poultry, as well as to identify the particular meat species. In this manner, the antibodies of the invention are useful for meat type or class as well as particular meat species identification.

[0039] Two broad types or classes of antibodies or monoclonal antibodies may be prepared by the methods described above. One type encompasses antibodies which bind thermal-stable proteins. Such antibodies are capable of binding to both cooked and raw meat samples. Thus, these antibodies are useful for identification of meats in both raw and cooked meat samples.

[0040] The second type of antibodies and monoclonal antibodies of the invention are capable of binding cooked meat samples. However, it is recognized that for species identification, both raw and cooked meats can be utilized in the invention. Where the sample of the meat is raw, a heat denaturing step will be needed. Accordingly, the sample can be heated, i.e., boiled, prior to contacting the sample with the antibody.

[0041] Because the antibodies are both meat and class specific, they are useful in the detection of species substitution in meats. To facilitate their use, kits containing the antibodies can be made. The antibodies can be coated onto a solid phase, such as ELISA microliter plate, dipstick, magnetic beads, and the like, and used as a sensitive reagent to accurately detect a meat of interest in both cooked and raw meat products. This commercial kit form is useful for rapid and convenient use by regulatory agencies and the meat industry. By "kit" is intended that the monoclonal antibody and any necessary reagents are contained in close confinement in the form of a ready-to-use test kit. The antibodies of the invention are useful in non-competitive ELISA, including double-sandwich ELISA assays as well as competitive assays. However, other formats such as homogeneous enzyme immunoassays may be developed.

[0042] The second type of antibodies or monoclonal antibodies of the invention also find use as indicators of end-point temperature of a cooked meat sample. Inadequate cooking is an important contributing factor in foodborne disease outbreaks caused by meat products. The second type of antibodies are developed against heat-denatured or heat degraded soluble proteins. Heat induces conformational changes of the protein molecules. In this manner, end-point temperature can be determined by using the antibody in an ELISA to detect the immunoreactivity changes of the heat treated muscle proteins. An increase in reactivity is noted due to increased heating process of the meat sample. The antibody allows for a means to determine end-point temperature to which beef and poultry have been processed.

[0043] Preferred embodiments of the invention include the following monoclonal antibodies which have been developed using heat-denatured or heat degraded proteins as antigens.

[0044] The monoclonal antibody 2F8, produced by hybridoma cell line 2F8 deposited as ATCC No. HB-12155, reacts with five commonly used mammalian cooked meats, pork, beef, lamb, horse and deer. The monoclonal antibody can be used as a capture reagent in ELISA to detect any of the five mammalian meats in a sample. The monoclonal antibody is particularly useful to identify meat adulteration of any of the five mammalian meats in a poultry product. It also finds use in determining the end-point cooking temperature for mammalian meats.

[0045] In another preferred embodiment, five monoclonal antibodies specific to cooked chicken muscle soluble proteins have been developed. These monoclonal antibodies represent three groups of cell lines which secret monoclonal antibodies to specifically react with heat denatured poultry meats. The first group of monoclonal antibodies are represented by the monoclonal antibody 3E12, produced by hybridoma cell line 3E12, deposited as ATCC No. HB-12154, are capable of distinguishing between cooked poultry meats (chicken, turkey and duck) and cooked land animal meats (pork, beef, lamb, deer and horse).

[0046] The second group of monoclonal antibodies represented by 6F7, produced by hybridoma cell line 6F7, react with cooked chicken without any cross-reaction to any other species tested. They are useful to distinguish chicken tissue from other non-chicken meats.

[0047] The third group of monoclonal antibodies represented by 5D2, produced by hybridoma cell line 5D2 deposited as ATCC No. HB-12156, react with both cooked chicken and turkey but not with other meat species.

[0048] All three classes of monoclonal antibodies react with cooked poultry proteins. However, the monoclonal antibodies can be used in testing raw meats as well as cooked meat products. For the analysis of raw meats, an additional heat treatment is required for sample preparation. The monoclonal antibodies can be used as a capture reagent in ELISA to detect poultry meats in a sample. They also find use in determining the adequate end-point cooking temperature for poultry meats.

[0049] The antigens for preparation of the above specifically listed antibodies are soluble heat-denatured or degraded protein or peptide units. Most of them are low molecular weight proteins/peptides having a molecular

weight in the range of up to about 35 kd. In the heating process, some muscle proteins are degraded into smaller units, most are denatured and many become insoluble. See, generally Tajima et al. (1991) *J. Home Econ. Jpn.* 42:967-971. The extract which is used as an immunogen is a crude soluble protein extract which has been heat treated. The use of the crude extract increases the number of species-specific antibodies which are produced. Particular antibodies can be selected based on binding characteristics.

[0050] Another preferred embodiment of the invention includes monoclonal antibodies prepared using thermal-stable muscle soluble proteins as antigens. The monoclonal antibody 5H9, produced by hybridoma cell line 5H9 deposited as ATCC No. HB-12245, reacts specifically with raw and cooked pork. No significant cross-reactivity is found among other meats including beef, lamb, horse, deer, chicken, turkey, and duck. Antibody 5H9 is useful for detecting pork in a heterogeneous meat sample.

[0051] The MAb 5H9 recognizes three protein bands with apparent molecular weights about 24, about 22 and about 20.5 kd in raw pork but recognizes one protein band of about 24 kd in cooked pork. The 24 kd protein was identified as a species specific thermo stable muscle protein.

[0052] The following experiments are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXPERIMENTAL

Example 1

Materials and Methods

[0053] Extraction of Cooked Meat Soluble Proteins

[0054] Lamb, turkey and duck meat were purchased from a local supermarket. Pork, beef and chicken meat were obtained from the Auburn University Meats Laboratory. Horse and deer meats were obtained from the College of Veterinary Medicine, Auburn University.

[0055] Extraction of soluble proteins was performed as follows. Thirty grams of meat from each species were cut into small pieces and blended separately by blender (Virtis Model 45, Gardiner, N.Y.) for one minute. Three fold (w/v) of saline solution (0.85% NaCl) was added to the blended meat. The homogenate was cooked by boiling at 100° C. for fifteen minutes. The soluble proteins were extracted by gentle agitation for two hours at 4° C. then centrifuged at 14,300×g for thirty minutes at 4° C. (Beckman J-21C, Palo Alto, Calif.). Supernatants were filtered through Whatman No. 1 filter paper (Maidstone, Kent, England) and stored at -80° C. until use.

[0056] The protein concentration of extracts was determined by protein assay kit II (Bio-Rad, Hercules, Calif.) based on the method of Bradford (1976). Bovine serum albumin was used as standard in this assay.

[0057] Immunization

[0058] Four ten-week-old female BALB/c mice (PRN 9612-R-0597) were immunized with the crude protein extract of cooked chicken. Mice were injected intraperitoneally or subcutaneously with an emulsion containing 100 µl of antigen (0.5 µg/µl of cooked chicken protein) and 100 µl of complete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, Mo.).

Three weeks later, mice were boosted with the same dose of antigen emulsified in incomplete Freund's adjuvant (Sigma). One week after, sera were collected from mice by tail vein bleeding. The sera were used to test the antibody titers against antigen using indirect ELISA. A final booster was done four days before fusion by injecting 200 µl of 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2 containing 50 µg of cooked chicken antigen into the mouse which had the highest antibody titer.

[0059] Production of Monoclonal Antibodies

[0060] Peritoneal macrophages were collected as feeder cells one day before fusion. Four days after the final booster, the injected mouse was sacrificed, and the spleen was harvested. Cells were washed from spleen by wash media (RPMI-1640 serum free medium supplemented with 1% oxaloacetate, pyruvate, and insulin (OPI) containing 1% glutamine, and 1% penicillin and streptomycin (p/s)) (Sigma). Cells of the murine myeloma cell line, P3X63, Ag8.653, ATCC CRL 1580 were retrieved from liquid nitrogen and cultured in large tissue culture plates (Corning, Corning, N.Y.). The culture procedure is described in Procedure A (page 31). The spleen cells were fused with myeloma cell line Ag8.653 in a 2:1 ratio using 50% polyethylene glycol (PEG) 4000 (Sigma) as the fusion agent. One ml of 50% PEG was gently added to the cells dropwise. After standing for one minute, 30. ml of wash media was added to cells dropwise. The fused cells were resuspended in Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) selective growth medium (RPMI-1640 supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS), 1% OPI, 1% glutamine, 1% p/s, 1% HAT) (Sigma) and seeded in 96-well tissue culture plates that have been set with mouse thymocyte feeder cells (Kohler and Milstein, 1975). The hybridoma cells were incubated at 37° C. with 5% CO₂ (Napco CO₂ incubator model 6300, Tualatin, Oreg.).

[0061] The supernatants of hybridoma cells were screened by indirect ELISA against cooked chicken antigen. Hybridoma cells from the positive wells were expanded to 48-well plates and collected supernatants to test against protein extracts from cooked pork, beef, lamb, deer, horse, chicken, turkey and duck for cross-reactivity.

[0062] Antibody-producing hybridoma cells of interest were selected and recloned twice by limiting dilution (Campbell, 1991). Cells were diluted with complete growth media (RPMI-1640 supplemented with 15% FBS, 1% OPI, 1% glutamine and 1% p/s) to give a concentration of 0.5 or 1 cell per well. Two hundred µl of each dilution were plated in each well to 96-well plates seeded with mouse thymocyte feeder cells. The subcloned hybridoma cells were screened using the method described previously.

[0063] The antibody-producing hybridoma cells were expanded from 96-well plate to 48-well plate. When the cells grew heavily in the well, they were expanded to 24-well plate, 12-well plate, small petri culture dish and large petri culture dish, sequentially. When cells grew heavily in the large petri dish, they could be frozen and stored in liquid nitrogen (Procedure B, page 32).

[0064] Elisa

[0065] Two µg of chicken antigen or protein extracts from the eight cooked meat species in 100 µl of carbonate buffer (0.06 M pH 9.6) was coated to each well of a 96-well

round-bottomed vinyl microtiter plate (Costar, Cambridge, Mass.) and incubated for 1 h at 37° C. or at 4° C. overnight. After washing three times with 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.2, containing 0.5% Tween-20 (PBST) using an immunowash microplate washer (Bio-Rad model 1250), 100 μ l of 1% bovine serum albumin (Sigma) in PBS were added to each well to block nonspecific binding sites. Following incubation for 1 h at 37° C., the plate was rinsed three times with PBST, and 100 μ l of hybridoma cell supernatant were then added to each well and incubated for 1 h at 37° C., and an additional hour at room temperature. After washing the plate with PBST three times, 100 μ l of diluted (1:3000 in PBS) horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Bio-Rad) was added and the plates were incubated for 1 h at 37° C. The plate was washed with PBST three times and 100 μ l of substrate solution containing 2,2'-azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonicacid] and hydrogen peroxide (Bio-Rad) was added to each well. The plate was incubated for ten minutes at 37° C. The reaction was stopped by adding 50 μ l of 10% oxalic acid and the absorbance was read in a microplate reader (Bio-Rad model 450) at 415 nm.

[0066] Isotyping of MAb

[0067] The isotype of MAb was determined by a mouse monoclonal antibody isotyping kit according to manufacturer's manual (Sigma).

[0068] Concentrating of Protein Extracts

[0069] Protein extracts of cooked meats were concentrated by ultrafiltration (Model 8050, Amicon, Beverly, Mass.) using a YM-10 membrane (Amicon). Nitrogen was applied to the system at 2114 g/cm² to facilitate the filtration process.

[0070] SDS-PAGE and Western Blot

[0071] Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to resolve the protein extracts of different cooked meat species. Western blot was then carried out to transfer proteins from gel to nitrocellulose membrane and to determine the molecular weights of immunogenic components which reacted with developed MAbs. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to the method of Laemmli (1970) with the following modifications. Proteins were separated on 4% acrylamide stacking gel (pH 6.8) and a 12% acrylamide separating gel (pH 8.8). The protein extracts of different cooked meat species were diluted one-half with sample buffer containing 2% (wt/vol) SDS, 5% (vol/vol) β -mercaptoethanol, 60 mM Tris hydrochloride (pH 6.8), 25% (vol/vol) glycerol and 0.0001% (wt/vol) bromophenol blue (Laemmli, 1970), boiled for 2 minutes, cooled, and applied to the gel at 10 μ g/well. The gel was electrophoresed at 200 V for 45 minutes using a Protean-II minigel system (Bio-Rad) connected to a power supply (Bio-Rad Model 3000). After electrophoresis, the resolved protein bands were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) at 100 V for 1 hour using an electroblotting apparatus (Bio-Rad) in blotting buffer (20 mM Tris, 250 mM glycine, 20% methanol) according to the method of Towbin et al. (1979). Upon completion of the electroblotting, the nitrocellulose membrane was blocked by 3% gelatin (Bio-Rad) in PBS for 30 minutes. Following two washes in Tris-buffered saline with Tween (TBST) (TBS, pH 7.5, containing 0.05% Tween-20), the membrane was incubated with hybridoma

supernatant in antibody buffer (1% gelatin in TBST) overnight at room temperature. The excess MAb was removed by washing twice with TBS, and the membrane was incubated with goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate diluted in antibody buffer (1:3000) for 1 hr at room temperature. After washing with TBST two times, and an additional wash with TBS, the membrane was incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) in alkaline phosphatase color development solution (0.1 M, pH 9.5 Tris buffer)(Bio-Rad). The reaction was stopped by washing the membrane in distilled water. The appearance of a dark purple band indicated the antibody binding site. The prestained PAGE broad range standards including myosin (M. Wt. 205,000), β -galactosidase (M. Wt. 116,500), bovine serum albumin (M. Wt. 80,000), ovalbumin (M. Wt. 49,500), carbonic anhydrase (M. Wt. 32,500), soybean trypsin inhibitor (M. Wt. 27,500), lysozyme (M. Wt. 18,500) and aprotinin (M. Wt. 6,500) were used as molecular weight markers in SDS-PAGE and Western immunoblotting.

[0072] Preparation of Adulteration Standards

[0073] The protein extracts of cooked chicken, turkey or duck were used as adulterants to cooked pork or beef. Different percentage (vol/vol) of adulterating protein extracts were mixed with pure protein extract of cooked pork. Protein concentration was calculated for each mixture according to the amount of protein in each pure protein extract. Each mixture was diluted in carbonate buffer (0.06 M pH 9.6) to the protein concentration of 2 μ g/100 μ l and used as antigen in ELISA.

Results and Discussion

[0074] Soluble muscle crude protein extract of cooked chicken was used as the antigen to immunize mice. Sera of all four immunized mice showed very high titers of antibodies against the antigen. Only the mouse showing the highest titer was sacrificed for fusion. Screening supernatants of hybridoma clones by indirect ELISA illustrated that a number of clones produced MAbs against cooked chicken antigen. Only the positive clones giving strong positive indirect ELISA were expanded to 48-well plates to obtain enough supernatant for testing against cross-reaction to other species (pork, beef, lamb, deer, horse, turkey and duck). One hundred and sixty-six clones were expanded and tested for cross reactivity and six were chosen for further study. When the six hybridoma cell lines were tested against cooked protein extracts of all species, MAbs secreted by cell line 6F7 were specific to chicken without noticeable cross-reactivity to pork, beef, lamb, deer, horse, turkey and duck was shown (FIG. 1). Hybridoma cell lines, 3E12 and 1A5, secreted MAbs specific to all three poultry muscle proteins (chicken, turkey and duck). There was no cross-reactivity to the five cooked mammalian meats for both MAbs (FIG. 2). Two other hybridoma cell lines, 5D2 and 6G8, secreted MAbs specific to cooked chicken and turkey. They showed no cross-reactivity to duck or five mammalian meats (FIG. 3).

[0075] The titers of the supernatants of these five hybridoma cell lines were determined by indirect ELISA (Table 1). The protein extracts of species that MAbs could react with were coated as antigens at 2 μ g/100, μ l to the ELISA plates. The titer was represented as the highest dilution fold

of supernatant where absorbance was higher than 0.1. Although MAbs 3E12 and 1A5 reacted to all three cooked poultry muscle proteins, the reaction intensity among these three species were different. Both MAbs showed the highest reactivity to turkey, followed by chicken and the lowest to duck. For MAb 5D2 which was specific to cooked chicken and turkey, the reaction titer for cooked turkey was higher than cooked chicken. Monoclonal antibody 6G8 showed the highest reactivity to cooked chicken and turkey among five MAbs and the reaction intensity was similar for both species for MAb 6G8.

[0076] All these 5 MAbs were IgG class MAbs. Four of the five hybridoma cell lines secreted IgG class MAbs subclass IgG1. Only the cell line 6F7 secreted IgG class MAb subclass IgG2b (Table 2).

[0077] Protein extracts of eight species of cooked meats were resolved by 12% SDS-PAGE and detected by Coomassie-blue staining (not shown). The results showed that extracts of three poultry species had similar protein patterns. At least fourteen, sixteen and nine protein bands were seen in the SDS-gel pattern of cooked chicken, turkey and duck protein extracts, respectively.

[0078] Protein extracts of three poultry species were separated by 12% SDS-PAGE. The resolved protein bands were transferred to a nitrocellulose membrane and detected using the undiluted supernatants containing MAbs to determine the immunogenic components in the protein extracts. The immunoblot of MAb 6F7 is shown in FIG. 4. A major band at 120 kDa in the protein extract of cooked chicken was found to react with MAb 6F7. Many minor continuous bands below 120 kDa also reacted with the MAb. The immunoblot shown in FIG. 5, shows that MAbs 3E12 and 1A5 shared the same sizes of proteins in all the three poultry species. The proteins detected by both MAbs in cooked chicken protein extract were located within 34, 30, 25 and 24 kDa. In turkey, two major bands at 29 and 22 kDa and two lesser reactive bands at 30 and 23.5 kDa were found. There was only one band at 30 kDa in duck protein extract which reacted with MAbs 3E12 and 1A5. For MAbs 5D2 and 6G8, the immunoblot indicated that the sizes of proteins which reacted with these two MAbs were the same (FIG. 6). Within chicken protein extract, there were three strong bands located at 30, 25 and 23.5 kDa and a lesser reactive band at about 35 kDa. There were strong reactions to 26 and 24.5 kDa bands in turkey protein extract for both MAbs. Two other immunoreactive bands were also present at 29.5 and 22 kDa. The result of immunoblots for these five MAbs is summarized in Table 3.

[0079] Meat adulterated samples were prepared by substituting pure cooked pork protein extract with different poultry protein extracts at 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80 and 100% (vol/vol) levels. All the meat adulterants were diluted to the same concentration (2 µg/100 µl) then coated to the ELISA plate. The indirect ELISA using the undiluted supernatants containing MAbs was employed to quantify the substitution of pork with chicken, turkey or duck in the prepared adulterated meats. Monoclonal antibody 3E12 and 5D2 could detect the presence of 1% or less of chicken meat in pork and/or beef. The absorbance increased as the substitution of poultry meats for pork in the test meat extracts increased. Both of these two MAbs could detect 0-100% of poultry meats in a non-poultry meat

sample. Zero to 100 percent of either chicken or turkey could be quantitatively detected using these two MAbs in both competitive and noncompetitive ELISA.

[0080] In addition using MAb 5D2 to determine end-point temperature of chicken with both competitive and non-competitive ELISA was feasible. Two representative figures included to demonstrate use of these MAb. See FIGS. 15 and 16.

[0081] It is not suitable to develop MAbs against native proteins for species identification of cooked samples because heat treatments result in protein denaturation or degradation. Therefore, a group of heat-denatured or heat degraded components derived from tissue are required to detect species in cooked meat. Crude cooked chicken soluble muscle proteins were used as antigens to produce MAbs. The results demonstrated that it does not necessarily require purified antigens as a prerequisite to develop species-specific MAbs.

[0082] One hybridoma cell line of each reaction pattern was chosen to produce large amounts of antibodies in ascites fluids. The titers of these ascites fluids were tested. Titers 1:200 was determined as suitable in indirect ELISA format while titer 1:6400 was chosen for competitive ELISA format.

[0083] Muscle proteins not blood serum proteins (serum albumin) were used as antigens to produce MAbs in this study. The blood proteins are used to raise polyclonal antibodies in commercial raw meat species identification kits. Their quantity in a given sample does not necessarily parallel the amount of the corresponding species meat (Jones and Patterson (1988). Recent Developments in Meat Specification. In *Immunoassays for Veterinary and Food Analysis-1*, B. A. Morris, M. N. Clifford and R. Jackman (Ed), p. 121-126. Elsevier Applied Science Publishers, London, England). The amount of serum proteins is affected by the residual blood left in the muscle after slaughter (Warris (1977) *Meat Sci.* 2:155-159). Therefore, the presence of serum proteins does not essentially denote the amount of the corresponding muscle tissue. In contrast to serum proteins, the amount of muscle protein is proportional to the presence of lean meat. It is suitable to be used for both qualitative and quantitative analysis in meat species identification (Martin et al. (1991) *Meat Sci.* 30:23-31).

[0084] Detection of small amounts of substituted meat supplies is a concern of consumers and regulatory agencies. The present assay was adequate to illustrate a quantitative detection over a wide range of mixture levels (0-100%). Development of a sandwich ELISA or the use of an avidin-biotin immunoassay (Klein (1990) Antigen-antibody interactions. In *Immunology*, p. 294-310. Blackwell Scientific Publications, Oxford, England) would increase the sensitivity of the developed MAbs to quantify poultry adulterant in red meat products.

[0085] Poultry may be added into pork product due to the similar light color. The unmarketable trimmings of poultry may also be substituted into other red meats. Poultry requires a minimal internal temperature of 71.1C to kill Salmonella. (USDA-FSIS (1994) Requirements for the production of poultry breakfast strips, poultry rolls, and certain other poultry products. Animals and Animal Products. Part 381.150, p. 495-496 of Chapter III. Title 9 of the Code of

Federal Regulations, Office of the Federal Register, National Archives and Records, Washington, D.C.). If beef or lamb product contaminated with poultry was not fully cooked, it might cause Salmonellosis. Hsieh et al. (1995) reported that 18% and 38% of ground pork and pork sausage samples analyzed were contaminated with poultry using ELISA, respectively. About 31% of ground beef and ground veal samples was also contaminated with poultry (Hsieh et al. (1995) *J Food Prot.* 58:555-559). A high percentage of adulteration with multiple species was also found in the ground pork and ground beef samples. The developed MAbs 3E12 and 1A5 could react with three poultry species and MAbs 5D2 and 6G8 could react with chicken and turkey. Therefore, these MAbs could be used in ELISA to detect the presence of poultry as a group in the cooked red meat products in a single test. It would be highly suitable and economical for an initial rapid screening of meat samples. Then MAbs 6F7 could be used for the specific identification of chicken adulterant in a positive sample. Furthermore, a convenient field test kit could be developed using these MAbs for meat inspectors.

TABLE 1

Titration of monoclonal antibodies against cooked poultry by indirect ELISA ^a			
Mabs	chicken	turkey	duck
6F7	128	—	—
3E12	64	256	32
1A5	64	128	32
5D2	64	128	ND
6G8	512	512	ND

^aTiters were represented as the highest dilution of supernatants that had absorbance above 0.1.

[0086]

TABLE 2

The isotypes of MAbs specific to cooked poultry	
Mabs	Ig siotype
6F7	IgG2b
3E12	IgG1
1A5	IgG1
5D2	IgG1
6G8	IgG1

[0087]

TABLE 3

Immunogenic components of SDS-PAGE-separated proteins extracted from poultry meats.			
(Kda)			
MAbs	chicken	turkey	duck
6F7	120	ND ^a	ND
3E12	34; 30; 25; 24	30; 29; 23.5; 22	30
1A5	34; 30; 25; 24	30; 29; 23.5; 22	30
5D2	35; 30; 25; 23.5	29.5; 26; 24.5; 22	ND
6G8	35; 30; 25; 23.5	29.5; 26; 24.5; 22	ND

^anot detectable

Example 2

Materials And Methods

[0088] Extraction of Cooked Meat Soluble Proteins

[0089] Muscle samples were purchased from a local supermarket (lamb, turkey and duck) or obtained from the Auburn University Meats Laboratory (pork, beef and chicken) and College of Veterinary Medicine (horse and deer), Auburn University.

[0090] Extraction of soluble proteins was performed as follows. Samples from each species was blended separately. Thirty grams of trimmed, lean meat from each species were cut into small pieces and blended separately by blender (Virtis Model 45, Gardiner, N.Y.) for 1 minute. Three fold (w/v) of deionized water was added to each sample. These homogenates were cooked and boiled at 100° C. for 15 minutes. The soluble proteins were extracted by gentle agitation of these homogenates for 2 hours at 4° C. then centrifuged at 14,300×g at 4° C. for 30 minutes (Beckman J-21C, Palo Alto, Calif.). Supernatants were filtered through Whatman No 1 filter paper (Maidstone, Kent, England) and stored at -80° C.

[0091] The protein concentration of the extracts was determined by Bio-Rad protein assay kit II according to manufacturer's protocol (Bio-Rad, Hercules, Calif.). The assay was based on the method of Bradford (1976) *Anal. Biochem.* 72:248-254. Bovine serum albumin was used as standard in this assay.

[0092] Mice Immunization

[0093] The antigen used for immunization was protein extract of cooked pork described previously. Four 10-week-old female BALB/c mice (PRN 9612-R-0597) were immunized intraperitoneally or subcutaneously with approximately 0.4 ml of an emulsion containing equal volumes of antigen (50 µg of cooked pork soluble protein) and complete Freund's adjuvant (Sigma, St. Louis, Mo.). Three weeks later, mice were boosted with the same dose of antigen emulsified in incomplete Freund's adjuvant (Sigma). Sera were collected by tail vein bleeding one week after the booster. The sera were used to test specific antibody production by indirect ELISA. Four days before fusion, a final booster was done by injecting intraperitoneally with 50 µg of antigen suspended in 200 µl 0.01 M pH 7.2 phosphate buffered saline (PBS).

[0094] Production of Monoclonal Antibodies

[0095] Four days after the final booster, the injected mouse was sacrificed by cervical dislocation. The spleen was removed aseptically and cells were teased and flushed from spleen by a large blunt forceps and 10 ml of wash media (RPMI-1640 supplemented with 1% oxaloacetate, pyruvate, and insulin (OPI), 1% glutamine, 1% penicillin and streptomycin (p/s)) (Sigma) in a 10 ml syringe. The spleen cells were fused with murine myeloma cell line P3X63, Ag8.653, ATCC CRL 1580, in a 2:1 ratio by using 50% polyethylene glycol (PEG) 4000 (Sigma) as the fusion agent. One ml of 50% PEG was gently added to the cells dropwise. After standing for 1 minute, 30 ml of wash media was added to cells dropwise. The fused cells were resuspended in Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) selective growth medium (RPMI-1640 supplemented with 15% fetal bovine

serum (FBS), 1% OPI, 1% glutamine, 1% p/s and 1% HAT) (Sigma) and seeded in 96-well tissue culture plates set with mouse thymocyte feeder cells. The hybridoma cells were incubated at 37° C. with 5% CO₂ (Napco CO₂ incubator model 6300, Tualatin, Oreg.).

[0096] Hybridoma cell growth was apparent 10 to 14 days after fusion. When the culture fluids became acidic, the hybridoma supernatants were screened by indirect ELISA against cooked pork antigen. Hybridoma supernatants from the positive wells were also tested against protein extracts from cooked beef, lamb, deer, horse, chicken, turkey and duck.

[0097] Antibody-producing hybridoma cells of interest were selected and recloned two times by limiting dilution (Campbell, 1991). Cells were diluted with complete growth media (RPMI-1640 supplemented with 15% FBS, 1% OPI, 1% glutamine and 1% p/s) to give a concentration of 0.5 cell or 1 cell per well. Two hundred μ l of each dilution were plated into each well of 96-well plates seeded with mouse thymocyte feeder cells. The recloned hybridoma cells were screened using the method described previously. The antibody-producing hybridoma cells of interest were expanded to 48-well, 24-well, 12-well plate, small and large petri dish, sequentially. Finally, they were frozen and stored in liquid nitrogen (Procedure B, page 32).

[0098] Production of Ascites Fluid

[0099] For producing large amount of MAbs, normal adult BALB/c mice were primed intraperitoneally with 0.5 ml of pristane. One week later, the mice were inoculated intraperitoneally with 1×10^7 hybridoma cells in 500 μ l of PBS. Approximately 10 to 14 days after inoculation, ascites fluid was collected daily for a week. Ascites fluid containing MAbs was centrifuged at 2,000 $\times g$ for 5 minutes to remove cells then stored in a sterile centrifuge tube at 4° C.

[0100] ELISA

[0101] Indirect non-competitive ELISA was used in this study. Two Ag of pork antigen or protein extracts from eight cooked meat species in 100 μ l of carbonate buffer (0.06 M pH 9.6) was coated to each well of 96-well round-bottomed vinyl microtiter plate (Costar, Cambridge, Mass.) and incubated for 1 h at 37° C. or at 4° C. overnight. After washing three times with 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.2, containing 0.5% Tween-20 (PBST) using an microplate washer (Bio-Rad model 1250), 100 μ l of 1% bovine serum albumin (Sigma) in PBS were added to each well to block nonspecific binding sites and the plate was incubated for 1 h at 37° C. After washing three times with PBST, 100 μ l of hybridoma cell supernatant were then added to each well and incubated for 1 h at 37° C. After another three washes with PBST, 100 μ l of diluted (1:3000 in PBS) horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (H+L) (Bio-Rad) were added. Following incubation for 1 h at 37° C., the plate was rinsed three times with PBST, and 100 μ l of substrate solution containing 2,2'-azino-di-[3-ethyl-bezthiazoline-6-sulfonic acid] and hydrogen peroxide (Bio-Rad) was added to each well. After 10 min incubation at 37° C., the reaction was stopped by adding 50 μ l of 10% oxalic acid and the absorbance was measured at 415 nm with a microplate reader (Bio-Rad model 450).

[0102] Isotyping of MAb

[0103] The isotype of MAb was determined by a mouse monoclonal antibody isotyping kit according to manufacturer's protocol (Sigma).

[0104] Protein Extract Concentrating

[0105] Protein extracts of cooked meats were concentrated by ultrafiltration (Model 8050, Amicon, Bervely, Mass.) using a YM-10 membrane (Amicon). Nitrogen was applied to the system at 2114 g/cm² to facilitate the filtration process.

[0106] SDS-PAGE and Western Immunoblotting

[0107] Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed to resolve the protein extracts of different cooked meat species. Western blot was then carried out to transfer proteins from gel to nitrocellulose membrane and to determine the molecular weights of proteins which reacted with developed MAbs. A Mini-Protean II electrophoresis unit (Bio-Rad) was used to perform SDS-PAGE. Proteins were separated on 4% acrylamide stacking gel (pH 6.8) and a 12% acrylamide separating gel (pH 8.8). The concentrated protein extracts of different cooked meat species were diluted with equal volume of sample buffer containing 2% (wt/vol) SDS, 5% (vol/vol) β -mercaptoethanol, 60 mM Tris hydrochloride (pH 6.8), 25% (vol/vol) glycerol and 0.0001% (wt/vol) bromophenol blue (Laemmli (1970) *Nature* 227:680-685), boiled for 2 minutes, cooled and applied to the gel at approximately 10 μ g per well. A constant voltage of 200 V was applied on the gel for 45 minutes by using a power supply (Model power pac 3000, Bio-Rad). After electrophoresis, the resolved protein bands were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) by the method of Towbin et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354, using a electroblotting apparatus (Bio-Rad). Blotting was performed at 100 V for 1 hour in blotting buffer containing 20 mM Tris, 250 mM glycine and 20% methanol. Upon completion of the electroblotting, the nitrocellulose membrane was soaked in 3% gelatin (Bio-Rad) in PBS for 30 minutes to block the unspecific binding sites. The membrane was incubated with hybridoma supernatant in antibody buffer (1% gelatin in TBST) overnight at room temperature after two washes in Tris-buffered saline with Tween (TBST) (TBS, pH 7.5, containing 0.05% Tween-20). Following two washes in TBST to remove the excess MAb, the membrane was incubated with goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate diluted in antibody buffer (1:3000) for 1 hr at room temperature. After washing with TBST two times, and an additional wash with TBS, the membrane was incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) in alkaline phosphatase color development solution (0.1 M, pH 9.5 Tris buffer) (Bio-Rad). When dark purple bands which indicated the antibody binding site appeared on the membrane, the reaction was stopped by washing the membrane in distilled water. The prestained PAGE broad range standards including myosin (M. Wt. 205,000), β -galactosidase (M. Wt. 116,500), bovine serum albumin (M. Wt. 80,000), ovalbumin (M. Wt. 49,500), carbonic anhydrase (M. Wt. 32,500), soybean trypsin inhibitor (M. Wt. 27,500), lysozyme (M. Wt. 18,500) and aprotinin (M. Wt. 6,500) were used as molecular weight markers in Western immunoblotting.

[0108] Preparation of Adulteration Standards

[0109] The protein extract of cooked pork and/or beef was used as adulterant to cooked chicken. A different percentage (vol/vol) (0, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100%) of adulterating protein extract was mixed with pure protein extracts of cooked chicken, respectively. Protein concentration was calculated for each mixture according to the amount of protein in each pure protein extract.

[0110] Results

[0111] During the screening process, numerous hybridoma clones produced MAbs against the cooked pork antigen. After recloning and testing cross-reactivity to other species (beef, lamb, deer, horse, chicken, turkey and duck), only one stable hybridoma cell line, 2F8, which secreted IgG2b type of MAb, was chosen. Because IgM antibodies are generally harder to purify and store, they were avoided in this study by selecting only IgG MAbs using IgG τ -chain specific probes, i.e., enzyme conjugated goat anti-mouse IgG (H&L) was used as the secondary antibody in the ELISA screening procedures. MAb 2F8 reacted with all five cooked mammalian muscle proteins (pork, beef, lamb, deer and horse) but showed no cross-reactivity to poultry muscle proteins (chicken, turkey and duck) or raw lamb and deer proteins (**FIG. 7**). A slight increase of ELISA background absorbance (<0.2) was observed in raw pork, beef and horse. Results suggested that proteins reacted with MAb 2F8 might be heat-denatured or heat degraded soluble proteins. This can be explained by the fact that after the heat treatment, the proteins unfolded and exposed epitopes which could be recognized by MAb 2F8. Native proteins, however, did not react to this MAb.

[0112] The titers of the supernatant and ascites fluid of hybridoma cell line 2F8 against cooked proteins of each species were also determined by indirect ELISA (Table 4). The titer was represented as the highest reciprocal dilution fold that still gave an absorbance higher than 0.1 MAb 2F8 showed a higher reactivity to pork, beef and horse than lamb and deer. The reactivities to cooked pork, beef and horse were similar, while the reactions to cooked lamb and deer were slightly weaker. Both the supernatant and ascites fluid showed high titers to the five cooked mammalian muscle proteins.

[0113] A pure immunogen is not necessary for developing a desirable MAb and a MAb is not necessarily monospecific. In this study, a partially purified pork protein extract was used as immunogen because antiporcine antisera usually show strong reactivity to pork proteins as well as other mammalian proteins before eliminating the cross-reactive antibodies by affinity columns (unpublished observation). MAb 2F8 was purposefully induced and selected to react with common motifs in the proteins of five taxonologically related mammalian species.

[0114] Although MAb 2F8 could react to all five cooked mammalian muscle proteins, the components it reacted with were different among species. (**FIG. 8**) From the result of Western blotting, we found that the protein extracts of all five mammalian meats showed two or more protein bands reacting with MAb 2F8 (**FIG. 2**) indicating that cooked meat proteins may be multivalent antigens. It could also be the identical sequential determinants carried by degradation products of different sizes. The molecular size of these

immunogenic components were small, ranging from 6.5 to 26.5 kDa, suggesting that they were either small proteins or heat degraded protein subunits or peptides. The dye front protein band (6.5 kDa) was present in all five species. Because pork muscle proteins were used as the immunogen to develop the MAbs, pork had the most immunogenic components (6 bands) that reacted with MAb 2F8. Beef showed 2 bands, horse 3, lamb 4, and deer had 2 bands. The number of immunogenic components in each species, however, did not correspond to the reactivity of MAb 2F8 to each species from ELISA responses. Epitopes available for antibody binding depend on antigen concentration and conformation. Some epitopes may be embedded inside of the antigen but were exposed after SDS-denaturation and thus be recognized by MAb 2F8.

[0115] The MAb 2F8 was further used to detect and quantify the amount of five mammalian animal meats in cooked chicken meat mixtures by ELISA. As shown in **FIG. 3**, the absorbance values increased proportionally with the increase of the amount of target species until a 15% substitution of pork, beef or horse was achieved in chicken. Because of the strong reactivity of MAb 2F8, the absorbances for the substitution higher than 15% were overscaled. At least 0.5% of adulteration of pork, beef, horse, and lamb could be detected using this MAb in indirect ELISA. For the substitution with lamb, the absorbance was proportional to the concentration of lamb meat in the range 0-50%. The substitution with deer showed the lowest reactivity with 5% and above of deer substitution being detected. The absorbance was not overscaled until it reached 75% of substitution with deer in chicken. The detection limit of this assay was defined as two standard deviation apart from the mean reading of the meat matrix containing no mammalian meat. The assay showed a good discrimination between chicken containing no mammalian meats and those containing a low amount of these meats.

[0116] Martin et al. (1991) *Meat Sci.* 30:23-31, detected 1-100% chicken meat in the mixture of raw beef and pork by a MAb-based sandwich ELISA. By using polyclonal antibodies-based ELISA, beef containing 0.5% of pork and beef products with 1% of the lean pork could be differentiated visually (Jones and Patterson (1985) *Meat Sci.* 15:1-13). Stevenson et al. (1994) *Food Agric. Immunol.* 6:297-304, also reported the detection of chicken in beef at 1% level by indirect ELISA with polyclonal antibodies as capture reagent. All of the antibodies mentioned above were developed to identify one species at a time. Recently, Billett et al. (1996) *J. Sci. Food Agric.* 70:396-404, developed MAb to detect a group of poultry meats (chicken, turkey, pheasant and duck) at the 100 g per kg (10%) mixed meats level. MAb 2F8, however, has potential to be used for detection and quantification of mammalian meats in cooked poultry meats at low levels of adulteration (0.5%) and over a wide range of adulteration levels. Research in optimizing ELISA method employing other formats such as, double sandwich ELISA, competitive ELISA and using streptoavidin-biotin amplification system, is ongoing in our laboratory to further increase the detection limit and achieve quantitative measurements in various types of meat product.

[0117] When cooked chicken meat was adulterated with a mixture of beef and pork, the ELISA absorbance reflected the total amount of the two adulterating species (Table 5). The mean absorbance readings ranged 0.802 to 1.149 and 1.644 to >2 for a total of 5% and 10% level of substitution, respectively. The absorbance was overscaled for all combi-

nations of 15% substitution. Results suggested that although differentiating species among the five mammalian meats was not possible, a total amount of mammalian meat adulterants could be semiquantitatively determined using MAb 2F8.

[0118] The consumption of poultry has been increasing due to health concerns of less saturated fat and a lower price in comparison to mammalian meats. Hsieh et al. (1995) *J. Food Prot.* 58:555-559, reported that beef or sheep meats were found as contaminating species in ground turkey on retail markets. The reasons for substituting cheaper meat such as poultry with more expensive meat like beef and sheep include the use of the unmarketable trimmings from expensive meats and improper cleaning of the grinder between each change of meat species for grinding. The widespread species adulteration in retail markets may be attributed to the inadequate meat inspection and the lack of a suitable and affordable analytical method. Using ELISA with MAb 2F8, the presence of any of the five mammalian meat adulterants in a cooked poultry could be detected with a single test visually or semiquantitatively. The developed MAb should be useful in an initial rapid screening test for a large number of samples in a laboratory and it can be made into a field test kit for meat processors and inspectors to be used on site. Money and time could be saved, reserving resources so even more samples could be tested and more retail stores inspected. Furthermore, this MAb can be used for not only cooked but raw meat species identification. For testing raw meats, only an additional heat treatment (100° C., 15 min) is required during sample preparation.

TABLE 5

Indirect ELISA response expressed as absorbance (A) at 415 nm for cooked chicken substituted by various combinations of cooked pork (P) and beef (B) at total concentrations of 5%, 10%, and 15% by weight.

5%	A _{415a}	10%	A ₄₁₅	15%	A ₄₁₅
1% P + 4% B	0.840 ± 0.031 ^a	1% P + 9% B	1.671 ± 0.097	2% P + 13% B	>2
2% P + 3% B	0.873 ± 0.009	3% P + 7% B	1.781 ± 0.027	5% P + 10% B	>2
3% P + 2% B	0.802 ± 0.003	5% P + 5% B	1.604 ± 0.025	8% P + 7% B	>2
4% P + 1% B	1.149 ± 0.032	8% P + 2% B	>2	10% P = 5% B	>2
5% P	1.014 ± 0.015	10% P	>2	15% P	>2
5% B	1.008 ± 0.011	10% B	1.775 ± 0.21	15% B	>2

^aValues represented are means ± SD (n = 6).

[0119]

TABLE 4

Titration of monoclonal antibodies against cooked five land animal meats by indirect ELISA^a
MAb 2F8

Supernatant	Ascites Fluid
pork8192 ^b	6.6 × 10 ⁶
beef8192	6.6 × 10 ⁶
lamb4096	3.3 × 10 ⁶
deer4096	3.3 × 10 ⁶
horse8192	6.6 × 10 ⁶
chicken41600	
turkey81600	
duck41600	

^aTiters were represented as the highest dilution of supernatants that had absorbance over 0.1.

^bMeans of triple readings.

Procedure A.

Retrieve Myeloma Cells from Liquid Nitrogen

- [0120] 1. retrieve myeloma cells from liquid nitrogen
- [0121] 2. put the vial into a 37-39° C. water bath to thaw the cells
- [0122] 3. add 9 ml of growth media (RPMI-1640, 10% FBS, 1% p/s) drop by drop to resuspend the cells
- [0123] 4. centrifuge at 1,700 rpm for 5 min
- [0124] 5. resuspend cell pellet in 5 ml of growth media
- [0125] 6. perform the cell count
- [0126] 7. centrifuge at 1,700 rpm for 5 min
- [0127] 8. resuspend the cells in 5 ml of growth media
- [0128] 9. transfer the cells to the petri dish

Procedure B.

Procedure of Freezing Hybridoma Cells

- [0129] 1. Scrape cells from the petri dish
- [0130] 2. centrifuge at 1700 rpm for five minutes to get cell pellet
- [0131] 3. resuspend cell pellet with 500 µl of CGM

[0132] 4. Add 500 µl of freeze media containing six parts of FBS, two parts of CGM and two parts of dimethyl sulfoxide (DMSO) drop by drop

[0133] 5. Cell suspension was transferred to a cryogenic vial and stored in liquid nitrogen.

Example 3

Methods

[0134] Sample Preparation

[0135] Beef was trimmed off external fat and connective tissue and ground twice using a hand grinder. Samples were stored in a freezer at 20° C. until use. After thawing, eight grams of ground beef were packed into the bottom section of 22 mm×150 mm glass tubes. Temperature was monitored by inserting a stainless steel probe into the geometric center of the sample. The glass tubes with sample were placed in a temperature-controlled circulated water bath maintained at

desired target temperatures. When internal temperature of the sample reached the target temperature (0-100° C.), tubes were removed and immediately cooled in an ice-water bath.

[0136] Cooked beef samples were homogenized in 1:3 volumes (w/vol) of 0.85% NaCl. The slurry was centrifuged at 5,000×g for 15 min at 4° C. The supernatant was filtered through a Whatman no. 1 filter paper. Soluble protein content of the filtrate was determined by dye binding assay (Bio-Rad) using bovine serum albumin as standard.

[0137] ELISA Procedure

[0138] Optimization of the ELISA procedures was achieved by cross titration of antigen (meat extract) and antibody. The indirect ELISA was performed by coating polyvinyl microtiter wells with 100 ul of 0.1M carbonate buffer (pH 9.6) containing 0.25 ug of soluble proteins from the extract. Plates were incubated at 37° C. for 1 hr and placed in a refrigerator at 4° C. overnight. Wells were washed three times with PBST and remaining binding sites were blocked by adding 150 ul of 1% BSA-PBS and incubating at 37° C. for 1 hr. MAb 2F8 diluted 1:6400 in PBS was added to wells (100 ul per well); plate was incubated for 1 hour at 37° C. After washing with PBST, IgG peroxidase conjugate diluted (1:2500) in PBS was added to each well. Plate was incubated for 1 hr at 37° C. and washed five times, and bound peroxidase was determined with ABTS substrate. Absorbance was read at 405 nm using a Microtiter plate reader (Bio-Rad).

[0139] SDS-PAGE and Western Blotting

[0140] SDS-PAGE was used to determine protein composition of the meat extracts. Soluble proteins were separated on a 12% acrylamide gel using a Mini-Protein II electrophoresis unit (Bio-Rad). The resolved protein bands were transferred electrophoretically from the SDS-PAGE gel to a nitrocellulose membrane. The reaction of proteins with MAb 2F8 was detected by goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate followed adding of the enzyme substrate.

[0141] Results and Discussions

[0142] ELISA response to the beef extract showed a temperature-dependent reactivity (FIG. 9). Binding of MAb 2F8 to soluble proteins of beef extract was extremely low when samples were cooked to end-point temperatures of 60° C. or below. ELISA responses slightly increased as cooking temperature increased from 60° C. to 66° C.; increased rapidly and constantly from 66° C. to 80° C. Temperature required for denaturing the majority of beef soluble proteins has been observed within the range of 60° C. to 80° C. Meat extracts from different cooking temperatures can be differentiated at least at 2° C. intervals ranging from 66° C. to 80° C. ($P<0.05$). A linear increase of the reactivity, with a correlation coefficient of 0.997, was also observed as increase of the end-point temperature from 66° C. to 80° C. (FIG. 10). These results suggest that determination of end-point temperature of cooked beef can be achieved within this range using MAb 2F8.

[0143] Soluble protein patterns at different temperatures were obtained by SDS-PAGE of the cooked beef extracts (not shown). Solubility of muscle proteins decreased rapidly when beef was heated between 50° C. and 70° C. and remained fairly constant above 80° C. The binding of MAb

2F8 to the antigen was further examined by Western Blot (FIG. 11). MAb bound to proteins with molecular weight of 21 KD and others with molecular weight smaller than 19.4 KD in all cases; in addition, several soluble proteins with large molecular weight could also be detected by the MAb when beef was heated below 70° C. or when the raw meat extract was denatured by SDS treatment. It appeared that this MAb recognized a group of soluble proteins which contribute a common epitope on their surface after denaturation. As the heating temperature increased, most of the proteins which were present in the raw meat extract became insoluble; only the proteins retained in the cooked meat extract were detected by the MAb. Because of the same amount of proteins was applied in our ELISA procedures, the increase of the reactivity was attributed to the increase of thermally induced changes of the proteins as detected by the MAb. It may be that heat treatment induces the structural changes of the protein molecules and exposes the epitope region which is absent or rare on the native molecules. The changes may be conformational or alternatively may be due to the fragmentation of native proteins. Proteins with varied sensitivity to heat treatment expose these epitope at different temperature range; this can be a possible reason for the observed temperature-dependent responses in our ELISA procedures.

[0144] These findings lead us to propose the use of denatured soluble proteins as an indication of end-point temperature of cooked meat products. Most of the currently developed methods were based on detection of single protein marker or enzyme activity. The distribution of the protein or enzyme, however, varies depending upon the different portion of muscle tissue. Detection of proteins as a group in terms of their immunoreactivity after denaturation appears to be less influenced by these factors.

[0145] Undercooked meat products are responsible for numerous foodborne outbreaks. Valid methods for evaluating the adequacy of heat processing in cooked meat will significantly reduce this risk of the consumer. Most currently developed methods were based on the decrease of protein solubility or residual enzyme activity as an indication of EPT. They have inherent limitations including the relatively low sensitivity, narrow temperature range and variation among different muscle tissues. USDA-FSIS suggested that new approaches should be explored, such as determining the increases of some chemical compounds as EPT increases (Ang, et al., 1994).

[0146] As is evident in our study, using MAb as a probe to detect the heat induced conformational changes of the soluble muscle is feasible. The most attractive features of our proposed approach are: (1) Measurements based on the protein denaturation are positively related to heat treatment; (2) High sensitivity of ELISA provides accurate and rapid screening of a large number of samples; (3) Monitoring the denaturation of a group of proteins has less variation than a single protein marker, and (4) Wide temperature range application is possible. The developed MAb based ELISA may be commercialized as test kit for use by the food industry, food service operations and regulatory agencies.

Example 4

Monoclonal Antibodies For Detection of Pork

[0147] Methods for identification of raw meat based on ELISA have been well established (Whittaker, R. G., Spen-

cer, T. L., and Copland, J. W. (1983) *J. Sci. Food Agric.*, 34:1143-1148; Griffiths, N. M., and Billington, M. J. (1984) *J. Sci. Food Agric.* 35:909-914; Patterson, R. M., Whittaker, R. G., and Spencer, T. L. (1984) *J. Sci. Food Agric.* 35:1018-1023; Jones, S. J., and Patterson, R. L. S. (1986) *J. Sci. Food Agric.* 37:767-775; Martin, R., Azcona, J. I., Casas, C., Hernandez, P. E., and Sanz, B. (1988) *J. Food Prot.* 51:790-794; and, Ayob, M. K., Ragab, A. A., Allen, H. C., Farag, R. S., and Smith, C. J. (1989) *J. Sci. Food Agric.* 49:103-116). Detection of species adulteration in cooked meats appears to be more complicated than in the raw meats because heat induces denaturation of most immunogenic proteins. Therefore, the antigens for cooked meat identification should be able to withstand cooking or can be renatured after heating.

[0148] Hybridoma techniques, developed by Kohler and Milstein enable continuous production of MAbs with defined specificity (Kohler, G., and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497). MAbs have been applied to ELISA for raw meat identification (Martin, R., Wardale, R. J., Jones, S. J., Hernandez, P. E., and Patterson, R. L. S. (1991) *Meat Sci.* 30:23-31; Garcia, T., Martin, R., Morales, P., Haza, A. I., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B., and Hernandez, P. E. (1994) *J. Sci. Food Agric.* 66:411-415; Morales, P., Garcia, T., Gonzalez, I., Martin, R., Sanz, B., and Hernandez, P. E. (1994) *J. Food Prot.* 57:146-149; Billett, E. E., Bevan, R., Sanlon, B., Pickering, K., and Gibbons, B. (1996) *J. Sci. Food Agric.* 70:396-404). However, MAbs are not available for detection of species adulteration in cooked meat products. The production of species-specific MAbs to the thermal-stable muscle proteins (TSMPs) provide an unlimited supply of uniform reagents capable for both raw and cooked meat identification. Therefore, the present invention provides (1) MAbs specific to pork TSMPs, (2) porcine-specific MAbs and their correspondent antigens, (3) a MAb-based ELISA for detection of pork in raw and cooked meat products.

[0149] Materials and Methods

[0150] Antigen Preparation

[0151] TSMPs from pork were prepared by modifying the method described by Milgrom and Witebsky (1962) *Immunology* 5:46-66. Briefly, after removing fat and connective tissue, skeletal muscle tissue (100 g) was homogenized in 0.15 M CaCl (1:2 w/v) using a Brinkmann Polytron Homogenizer (Model PT 10/35, Brinkmann Instruments Co., Westbury, N.Y.). The slurry was further sonicated (50 W, 20 KHz, 5 min.) with a Model 4710 Ultrasonic Processor (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, Ill.), heated in boiling water for 20 min, and centrifuged at 2,000 g for 30 min. The supernatant was autoclaved at 121° C. for 30 min, centrifuged at 5,000 g for 30 min and filtered through Whatman No. 1 filter paper. The precipitate was formed by adding 90% ethanol (1:3.74 vol/vol) and dried in a convection oven at 37° C.

[0152] Immunization

[0153] The dry material was dissolved in a small amount of saline solution; the protein concentration of the preparation was determined by a Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, Calif.) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Four female BALB/c mice (6-8 weeks) were injected either intraperitoneally or subcutaneously with 100

μ g/mouse of the TSMPs in 200 μ l phosphate buffered saline (PBS, 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) emulsified with same volume of Freund's complete adjuvant. Four Boost injections prepared in the same manner using Freund's incomplete adjuvant were applied to each mouse at four week intervals. Test sera from mice were collected eight days after each boosting by tail bleeding; titer of the sera was determined by ELISA. The mouse showing the highest titer was injected intraperitoneally with 100 μ g of TSMPs in PBS four days before fusion.

[0154] Monoclonal Antibody Production

[0155] The spleen cells from the immunized mouse were fused with myeloma cells for hybridoma production. The general procedures as described by Kohler and Milstein were followed with necessary modification to be performed in our laboratories (Kohler, G., and Milstein, C. (1975) *Nature*). Hybridomas were initially screened for reactivity to cooked pork extract by ELISA 10 to 14 days after fusion. The positive clones from the wells of original fusion plates were then transferred to larger wells and cultured for 2-3 more days; the culture supernatants were collected and tested against cooked meat extracts of other species. The hybridomas secreting antibodies react only with pork were selected and cloned twice by limiting dilution. MAbs were obtained in supernatants from propagated cell cultures and in ascitic fluid from mice inoculated with hybridoma cells. The isotype of MAbs were determined by a Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) following the manufacturer's instruction.

[0156] Epitope Comparison

[0157] A convenient ELISA method developed by Friguet et al. was adapted for comparison of relative binding sites of MAbs on the antigen (Friguet, B., Djavadi-Ohanian, L., Pages, J., Bussard, A., and Goldberg, M. (1983) *J. Immun. Meth.* 60:351-358). Cooked meat extract from pork (0.5 μ g protein/well) was coated onto the microtiter plate. The optimal dilution of each MAb was determined by checkerboard titrations to ensure sufficient antibody to saturate the antigenic sites of TSMPs. Same volume (50 μ l each) of diluted MAbs to be compared was added to the well simultaneously; the amounts of bound antibody were quantitatively measured using procedures as described in the ELISA method.

[0158] Sample Preparation and Extraction

[0159] Meat samples of different origin (pork, beef, lamb, horse, deer, chicken, turkey, and duck) were obtained fresh and ground separately in our laboratory; ground meat samples were stored at -20° C. until use. Adulterated meat samples were prepared by mixing known amounts of pork (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 and 800 g/kg) in either beef or turkey. Cooked samples were prepared by packing 10 g of meat in 1.5x15 cm glass tubes and heating in boiling water for 20 min. Raw and cooked samples were extracted by adding 20 ml of saline solution to 10 g of meat and homogenizing in a Brinkmann Homogenizer. The slurry was set at 4° C. for 2 hrs. and filtered through a Whatman No. 1 filter paper. The protein concentration of the filtrate was determined using a Protein Assay Kit (Bio-Rad).

[0160] Indirect ELISA

[0161] Wells of microtiter plates (polyvinyl chloride plates, Costar, Cambridge, Mass.) were coated with 100 μ l

of meat extracts diluted in 0.06 M carbonate buffer (pH 9.6) at 37° C. for 1 hr; the protein content for coating was 2 µg/well for antisera titration, hybridomas screening, and meat sample analysis, and 0.5 µg/well for epitope comparison. Plates were washed three times with 200 µl of PBS containing 0.05% (vol/vol) Tween 20 (PBST) using a microplate washer (Bio-Rad, Model 1250) and incubated with 200 µl of blocking solution (1% BSA in PBS) at 37° C. for 1 hr to minimize nonspecific binding followed by another washing steps. Optimal dilutions for each MAbs were predetermined by checkerboard titrations. MAbs appropriately diluted in blocking solution (100/µl) were added to the well and the plate was incubated at room temperature for 1 hr. After washing the plate, 100 µl of horseradish peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG (Bio-Rad) diluted 1:2500 in blocking solution was added to each well. The plate was incubated at room temperature for another 1 hr and washed six times before the addition of 100 µl of substrate solution (22 mg of 2,2'-azino-di-[3-ethyl-benothiazoline-6-sulfonic acid] and 15 µl of 30% hydrogen peroxide in 100 ml of 0.1 M phosphate-citrate buffer pH 4.0). Color development was processed at room temperature for 30 min and the enzyme reaction was stopped by adding 100 µl of 0.1 M citric acid to each well. Absorbance of each well was measured by a microplate reader (Bio-Rad, Model 450) at 415 nm.

[0162] Electrophoresis and Immunoblotting

[0163] Soluble proteins of meat extracts were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using a Mini-Protein II electrophoresis unit and a power supply Model 3000 (Bio-Rad) with stacking and separating gels of 4 and 12% acrylamide, respectively. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R 250 and the apparent molecular weight of bands was calculated using a calibrating curve constructed from molecular weight standards. Soluble proteins of meat extracts were transferred electrophoretically (1 hr at 100V) from gel to nitrocellulose membrane using a Mini Trans-Blot unit (Bio-Rad) with 25 mM Tris, 192 mM glycerine, and 20% (vol/vol) methanol buffer (pH 8.3). Upon completion of the transferring, the membrane was washed with TBST (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5), blocked with 20 ml of 3% gelatin in PBS for 1 hr, and incubated with 20 ml of ascitic fluid diluted 1:2000 in antibody buffer (1% gelatin in TBST) 2 hr at room temperature. The excess antibody was removed by washing with TBST, and the membrane was incubated with 20 ml of goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate diluted 1:3000 in antibody buffer for 1 hr at room temperature. After washing, the membrane was incubated with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride (BCIP/NBT) in 0.1 M Tris buffer, pH 9.5. The color development was observed between 10-20 minutes and straining was stopped by washing the membrane with distilled water.

Results and Discussion

[0164] Species Specificity of MAbs

[0165] Four hybridoma cell lines, designated as 2E2, 5H8, 5H9 and 8A4, were selected after screening of supernatants from all wells of fusion plates. Isotype of MAbs secreted by these hybridomas was determined as IgG1 subclass. The quantity of MAbs was obtained in ascitic fluid for subsequent analysis; purification of MAb from ascitic fluid was

not necessary because no significant nonspecific binding was observed and the ELISA performance was satisfactory when direct dilution of ascitic fluid was used. All MAbs reacted strongly with cooked pork extract and showed no cross-reaction with cooked meat extracts from beef, lamb, horse, deer, chicken, turkey and duck as determined by indirect ELISA (FIG. 12). A similar reaction pattern among the species also was observed for all MAbs when raw meat extracts were tested. The ability of the MAbs to detect both raw and cooked pork evidenced the heat resistance of the TSMPs which was present in raw meat and remained soluble and antigenic after cooking. During the checkerboard titrations, MAb 5H9 consistently showed higher maximum binding than the other three MAbs; this might be an indication of highest affinity of 5H9 among the four MAbs. Morales et al. produced a MAb specific to porcine muscle proteins for meat speciation (Morales, P., Garcia, T., Gonzalez, I., Martin, R., Sanz, B., and Hernandez, P. E. (1994) *J. Food Prot.* 57:146-149). Their method was able to detect the presence of pork in raw meat but not cooked products. The MAbs produced in this work is the first reported MAbs capable for identification of pork in both raw and cooked status.

[0166] Porcine-Specific TSMP

[0167] The ability of the MAbs to differentiate equivalent protein bands of pork from other species was observed when proteins were transferred from gel to nitrocellulose membrane and probed by MAbs to reveal the immunoreactive components in raw and cooked meat extracts. It is clear that all four MAbs reacted with proteins of pork origin but not with proteins from beef, lamb, horse, deer, chicken, turkey and duck. The results confirmed the porcine-specificity of MAbs observed previously by indirect ELISA. All of the MAbs showed the same reaction pattern on the immunoblot; three protein bands with an apparent molecular weight of 24, 22, and 20.5 kD in raw pork were recognized while only one protein band with a molecular weight of 24 kD was detected in cooked pork by all four MAbs. (FIG. 13) Failure to detect the two protein bands (22 and 20.5 kD) in cooked meat extract indicated the absence of these proteins which may become insoluble after heating. The 24 kD protein present in both raw and cooked pork extract was identified as porcine-specific TSMP. Several researchers have attempted to resolve the thermal-stable components of different meat species. Jones and Mortimer demonstrated that the thermal-stable proteins eluted in a low pH range (3.5-6.5) and characteristic pattern of thermal-stable protein from different species was not noticeably different using isoelectrofocusing (Jones, S. J., and Mortimer, R. H. (1985). Species identification of cooked meats by isoelectrofocusing: preliminary studies to resolve heat-stable components isolated from adrenal and muscle tissue. In: *Biochemical Identification of Meat Species*, Patterson, R. L. S. (Ed.), p. 118-128. Elsevier Science Publishing, Inc., New York). Sherikar and coworkers reported that "troponin T", with a molecular weight of 36 kD, is the species-specific antigenic fraction of TSMPs (Sherikar, A. T., Karkare, U. D., Khot, J. B., Jayarao, B. M., and Bhilegaonkar, K. N. (1993) *Meat Sci.* 33:121-136). The present results did not agree on the identity of the species-specific TSMP, but did confirm the existence of this protein in muscle tissues. The production of MAb does not require a pure protein as an immunogen. MAbs to the species-specific components in partially purified muscle proteins can be selected by appropriate screening procedures

(Garcia, T., Martin, R., Moreales, P., Haza, A. I., Anguita, G., Gonzalez, I., Sanz, B., and Hernandez, P. E. (1994) *J. Sci. Food Agric.* 66:411-415). In the present case, the occurrence of all four MAbs from different hybridoma cell lines coincidentally recognizing the same proteins indicated that the TSMP of 24 kD may be the only species-specific component present in the cooked pork extract.

[0168] Detection of Pork Adulteration

[0169] All four MAbs developed in this work exhibit several similar characteristics. MAb 5H9 with potentially higher affinity than others was chosen for the subsequent analysis. The optimal condition for ELISA was determined by checkerboard titrations. The highest sensitivity of assay was achieved using 2 µg/well of proteins from meat extracts and 1:102,400 dilution of ascitic fluid and 1:2,500 dilution of goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate. The developed ELISA successfully detected adulteration of pork in raw and cooked meat mixtures. The detection limit of the assay, defined as two standard deviation apart from mean reading of the heterogenous meat matrix containing no pork, was 10 g/kg of pork in heterogenous meat mixtures which is adequate in determination of low level of adulteration of pork in meat products. The curvilinear relations of second-degree polynomial with high correlation coefficient ($r^2 > 0.995$) between pork contents and ELISA responses can serve as standard curves for quantifying pork in beef (76) and pork in turkey (Table 9) for both raw and cooked status.

TABLE 6

Detection of Pork in Beef by ELISA Confidence limits for mean values of <u>different percentages of pork in beef</u>			
% pork in beef	mean OD* (405 nm)	Lower 99%	Upper 99%
0	.012	.010	.014
1	.059	.056	.062
2	.150	.120	.180
4	.219	.192	.246
8	.317	.281	.353

*mean of 5 replicates

[0170]

TABLE 7

Detection of Pork in Turkey by ELISA Confidence limits for mean values of <u>different percentages of pork in turkey</u>			
% pork in turkey	mean OD* (405 nm)	Lower 99%	Upper 99%
0	.004	.003	.005
1	.024	.020	.028
2	.041	.036	.046
4	.141	.125	.157
8	.282	.247	.317

*mean of 5 replicates

[0171] For raw meat speciation, serum proteins were used exclusively as antigens in developing immunoassays (Ayob, M. K., Ragab, A. A., Allen, H. C., Farag, R. S., and Smith, C. J. (1989) *J. Sci. Food Agric.* 49:103-116; Jones, S. J., and Patterson, R. L. S. (1986). A modified indirect ELISA

procedure for raw meat speciation using crude anti-species antisera and stabilized immunoreagents. *J. Sci. Food Agric.* 37:767-775; Patterson, R. M., Whittaker, R. G., and Spencer, T. L. (1984) *J. Sci. Food Agric.* 35:1018-1023; Whittaker, R. G., Spencer, T. L., and Copland, J. W. (1983) *J. Sci. Food Agric.*, 34:1143-1148). However, the presence of serum protein is not necessarily correlated to the presence of the muscle tissue, the quantitative aspect of these assay is not reliable (Griffiths, N. M., and Billington, M. J. (1984) *J. Sci. Food Agric.* 35:909-914). Moreover, serum proteins are denatured under the cooking practice; the use of serum proteins for cooked meat identification is merely impossible. Assays based on detection of muscle proteins is more indicative for quantifying the presence of extraneous muscle tissue in meat mixtures. The use of insoluble myofibrillar proteins, such as desmin, as antigen increases the complexity of extraction procedures (Billett, E. E., Bevan, R., Sanlon, B., Pickering, K., and Gibbons, B. (1996) *J. Sci. Food Agric.* 70:396-404). The developed assay requires only a simple saline extraction which will reduce time and labor for sample extraction and facilitate analysis in large-scale screening tests.

[0172] All publications and patent applications mentioned in the specification are indicative of the level of skill of those skilled in the art to which this invention pertains. All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

[0173] Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be obvious that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims.

That which is claimed:

1. A method for determining the end point temperature of a heat-processed meat sample, said method comprising the steps of:

- a) extracting proteins from a cooked meat sample to produce an extract; and
- b) contacting said extract with a monoclonal antibody capable of binding a heat-treated protein,

wherein said heat-treated protein is a thermal-stable protein or a heat-degraded protein or a heat-denatured protein, and wherein said monoclonal antibody exhibits an increase in reactivity with increased end-point temperature.

2. The method of claim 1, wherein said heat-treated protein is a thermal-stable protein.

3. The method of claim 1, wherein said sample comprises mammalian meat.

4. The method of claim 3, wherein said sample comprises beef meat.

5. The method of claim 3, wherein said sample comprises pork meat.

6. The method of claim 3, wherein said sample comprises lamb meat.

7. The method of claim 1, wherein said sample comprises poultry meat.

8. The method of claim 7, wherein said sample comprises chicken meat.

9. The method of claim 3, wherein said sample comprises turkey meat.

10. A method for determining the end point temperature of a heat-processed meat sample, said method comprising the steps of:

- a) extracting proteins from a cooked meat sample to create an extract;
- b) using said extract to coat a solid surface;
- c) contacting said extract with a monoclonal antibody capable of binding a heat-treated protein so that at least some of the monoclonal antibody binds to the sample on the plate;
- d) contacting said monoclonal antibody with a second antibody conjugated to an enzyme; and
- e) contacting said enzyme with a substrate so that an observable signal is generated.

11. The method of claim 10, wherein said solid surface is a polyvinyl surface.

12. The method of claim 10, wherein said heat-treated protein is a thermal-stable protein.

13. The method of claim 10, wherein said sample comprises mammalian meat.

14. The method of claim 13, wherein said sample comprises beef meat.

15. The method of claim 13, wherein said sample comprises pork meat.

16. The method of claim 13, wherein said sample comprises lamb meat.

17. The method of claim 10, wherein said sample comprises poultry meat.

18. The method of claim 17, wherein said sample comprises chicken meat.

19. The method of claim 17, wherein said sample comprises turkey meat.

* * * * *