

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA RTi-PCR PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INGREDIENTES DE ORIGEN ANIMAL EN PIENSOS COMPUESTOS

Vicente, F., González, M.T., Pérez¹, M., Presa¹, P., de la Roza-Delgado, B.

Área de Nutrición, Pastos y Forrajes. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). Apdo. 13; E-33300 Villaviciosa (Asturias). ¹Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología. Universidad de Vigo, E-36310 Vigo (Pontevedra).

fvicente@serida.org

INTRODUCCIÓN

La legislación europea prohíbe desde el año 2000 la utilización de harinas de carne y hueso para la alimentación animales destinados al consumo humano (Directiva 2000/766/CE). El método oficial de control de microscopía óptica (Directiva 2003/126/CE) resulta poco eficaz para su detección, identificación y cuantificación (Gizi y von Holst, 2002). Tiende a sobreestimar los ingredientes fácilmente distinguibles y a subestimar los de difícil identificación, presenta serias dificultades para identificar productos de origen animal (leche, grasa, etc.) y requiere de personal altamente especializado y experimentado. La propia norma europea establece que el examen microscópico puede ser reemplazado por otros métodos una vez demostrada su validez científica. Nuevas tecnologías se han desarrollado en los últimos años para la detección y cuantificación de la adición ilegal o contaminación cruzada de harinas animales en piensos (EU-project STRATFEED). En este proyecto se han estudiado, entre otras, las posibilidades de la tecnología NIRS para la detección rápida de harinas de carne (Garrido-Varo *et al.*, 2005) implementada con herramientas informáticas robustas que permiten minimizar los riesgos (de la Roza-Delgado *et al.*, 2005). Para la autenticación de especies animales en muestras sometidas a tratamientos térmicos severos se han desarrollado técnicas moleculares de PCR-RFLP (Dalama *et al.*, 2006). Sin embargo, éstas no permiten una cuantificación ni la detección simultánea de varias especies. En base a todo lo anterior, el presente trabajo se plantea con el objetivo de estudiar las posibilidades de la técnica de PCR a tiempo real (RTi-PCR) para la identificación simultánea y cuantificación de harinas animales de diferentes especies incluidas como ingredientes en piensos destinados a animales de abasto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material experimental: Como colectivo de muestras de validación se utilizaron 18 de piensos compuestos comerciales destinados 10 de ellos a animales de abasto, libres por lo tanto de harinas animales en su formulación, y 8 correspondientes a piensos de animales de compañía que sí contenían dicho ingrediente.

PCR cuantitativo: Tras el desengrasado de las muestras con una mezcla de cloroformo: metanol: agua (1:2:0,8 vol.) se procedió a la extracción y purificación del ADN mediante el método estándar fenol:cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). Se amplificó un fragmento de 464 pares de bases del citocromo b del ADN mitocondrial utilizando la química TaqMan® para el ADN de mamífero y el sistema SyBr-Green® para el de aves. Se diseñaron sondas TaqMan®-MGB y una pareja de cebadores para cada una de las especies de mamíferos. Para aves se utilizaron cebadores universales de esta especie (Herman, 2001). La especificidad de los cebadores y sondas seleccionados en cada especie se comprobó mediante análisis de homología de secuencia con la herramienta BLAST.

La amplificación se llevó a cabo con un termociclador fluorimétrico (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) en un volumen final de 25 µL. Para la amplificación de ADN de vaca y cerdo se emplearon en cada reacción 12,5 µL de TaqMan Master Mix 2x, 0,5 µL de

sonda TaqMan-MGB (2 mM), 0.75 μ L primer forward (3 mM), 0.75 μ L primer reverse (3 mM) y 1 μ L de ADN (dilución 1/10). Las condiciones de amplificación fueron 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos 20 segundos a 94°C, 55 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C. La medida de fluorescencia del ADN se realizó durante el paso de anillamiento. En el caso de las aves se emplearon en cada reacción 12,5 μ L de buffer SyBr-Green Master Mix, 0.75 μ L primer forward (3 mM), 0.75 μ L primer reverse (3 mM) y 1 μ L de ADN (dilución 1/10), con una secuencia de amplificación de 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 67°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final a 72°C durante 5 minutos más un ciclo de disociación de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 15 segundos a 95°C. La fluorescencia fue medida después de la fase de extensión.

La especificidad del producto amplificado se evaluó mediante el análisis de las curvas de disociación tras la reacción de PCR. Para el calibrado se incluyeron como estándares concentraciones conocidas de cada una de las especies a determinar, con patrones de 50, 12,5, 3,1, 1, 0,5 y 0,05 ng de ADN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación del ADN de vaca se produce entre los ciclos 20-22, ligeramente antes que la observada en cerdos (ciclos 22-26), mientras que en las muestras de ave, el ADN amplificado aparece a partir del ciclo 31. Además, la amplificación de ADN de ave es muy inferior a la ocurrida con el ADN de mamífero, con valores muy cercanos al valor del estándar inferior. Esto puede ser debido a la distinta configuración del ADN de las aves y al uso de primers comunes para toda la clase taxonómica y no específicos como en el caso de los mamíferos.

A partir de las curvas de predicción establecidas con los estándares se cuantificó la concentración en nanogramos de ADN. El colectivo de muestras de validación no ofreció ningún resultado falso negativo ni falso positivo. En la Tabla 1 se muestra la proporción declarada de harinas animales de los piensos de validación con la cuantificación estimada de ADN en cada una de ellas.

Tabla 1. Porcentaje declarado de ADN de cada especie en las muestras de validación y concentración de ADN amplificado (ng de ADN).

Muestra	Vacuno		Ave		Porcino	
	% Harina	ng ADN	% Harina	ng ADN	% Harina	ng ADN
3274-03	0	0	0	0	0	0
3275-03	0	0	0	0	0	0
3276-03	0	0	0	0	0	0
3277-03	0	0	0	0	0	0
3278-03	19,25	176,59	4,85	0,0364	8,00	480,42
3279-03	17,69	167,59	1,00	0,0284	8,00	38,62
3280-03	15,39	126,09	4,00	0,4454	8,00	114,02
3282-03	0	0	25,39	0,0864	8,00	53,02
3283-03	21,69	108,09	1,00	0,2004	5,00	45,92
3285-03	0	0	26,95	0,0354	8,00	48,02
3288-03	0	0	0	0	0	0
3292-03	25,00	107,29	4,39	0,6854	0	0
3294-03	23,79	131,49	4,00	0,6064	0	0
3295-03	0	0	0	0	0	0
3297-03	0	0	0	0	0	0
3298-03	0	0	0	0	0	0
3299-03	0	0	0	0	0	0
3300-03	0	0	0	0	0	0

Cuando se intentó estudiar la relación entre el porcentaje de harina animal declarado con la concentración de ADN medido, se observó que no existe una correlación clara entre ambos parámetros. Estudiando individualmente cada una de las especies, los resultados de las muestras de vaca presentan cierta correlación ($R^2 = 0.86$). Ésta es forzada al no tener falsos positivos ni falsos negativos y estar sesgada la recta hacia el valor de cero. Sin embargo, los casos en que sí hay ADN, tienen una amplificación bien apreciable, pero en ningún momento hay una relación entre los nanogramos de ADN amplificado y el porcentaje de harina declarado. Sin embargo, tanto en las muestras de cerdo como de aves. La dispersión de los resultados impide la relación directa entre porcentaje y concentración de ADN.

Es llamativa la poca amplificación del ADN de ave respecto al valor declarado, posiblemente debido a la baja concentración de ADN mitocondrial o a procesos de desnaturalización debidos al tratamiento térmico. En todos los casos los valores detectados están cercanos al límite de detección.

La falta de correlación observada entra dentro de lo esperado debido a que la cantidad de ADN mitocondrial es muy variable según los diferentes orígenes de los tejidos que entran a formar parte en las harinas elaboradas. Hay que señalar que aunque el ADN mitocondrial tiene menos información que el ADN nuclear, es mucho más abundante. Sin embargo, las células tienen un número variable de mitocondrias en función del tipo de tejido y de su estado fisiológico.

Los resultados obtenidos muestran que la PCR a tiempo real puede amplificar el ADN de origen animal en muestras de harinas elaboradas y sometidas a fuertes tratamientos térmicos. La PCR necesita de un control estricto en su realización para prevenir contaminaciones cruzadas, ya que la PCR puede detectar fuentes de ADN de origen autorizado, como leche o sangre, que podría ocasionar resultados falsos positivos, aunque en el proyecto STRATFEED se indica que un proceso de sedimentación podría prevenir los resultados positivos obtenidos por el uso de materiales autorizados. Como estrategia se podría combinar con otras tecnologías como la microscopía óptica o reflectancia en el infrarrojo cercano para "screening" y confirmar las muestras positivas por PCR dada su alta especificidad.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al personal auxiliar del Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA. El presente trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto MCYT GAN AGL2002-03131 e INIA CAL02-018-C2-1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dalama, J., Vicente, F., Pérez, M., Plaza Bolaños, P., Presa, P., 2006. Actas del Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria p: 29
- de la Roza Delgado, B.; Soldado, A.; Modroño, S.; Martínez, A.; Vicente, F.; Pérez Marín, M.A.; Garrido Varo, A.; Guerrero, J.E.; Bayón, G.F.; Quevedo, J.R., 2005. Proceedings of 12th International Conference on Near Infrared Spectroscopy.
- Garrido Varo A.; Pérez Marín M.A.; Guerrero, J.E.; Gómez Cabrera A.; de la Haba, M.J.; Bautista, J.; Soldado, A.; Vicente, F.; Martínez, A.; de la Roza Delgado, B.; Termes, S., 2005. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 9:3-9
- Gizi G, von Holst C, 2002. Join Research Centre of the European Commission, Institute for Health and Consumer Protection, Food Products Unit, Ispra, Italy.
- Herman, L. 2001. Journal of Dairy Research, 68: 429-436.
- Proyecto STRATFEED, <http://stratfeed.cra.wallonias.be>
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, pp E3-E4.