

## **AUTENTIFICACIÓN DE CIERVO (*Cervus elaphus*), GAMO (*Dama dama*) y CORZO (*Capreolus capreolus*) MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL**

Violeta Fajardo Martín y Teresa García Lacarra

Tutores: Isabel González Alonso y Rosario Martín de Santos

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

### **INTRODUCCION**

En España, el consumo de carne de caza mayor ha aumentado de forma notable en los últimos años debido, en parte, al auge de las explotaciones ganaderas dedicadas a la cría de especies cinegéticas. Las carnes y productos cárnicos procedentes de especies de caza mayor son a menudo objeto de un etiquetado fraudulento, dadas las diferencias de precio que se registran entre las distintas especies que se comercializan (Matsunaga y col., 1998). Este hecho justifica la necesidad de disponer de técnicas analíticas rápidas que permitan la adecuada identificación de estos productos y la verificación del cumplimiento de las normas de etiquetado (Partis y col., 2000).

En la actualidad, las técnicas genéticas, y concretamente las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), constituyen una de las alternativas más rápidas y específicas para llevar a cabo la identificación de especies en los alimentos (Cordella y col., 2002). Las técnicas de PCR convencionales, que se desarrollan en varios pasos desde la amplificación del material genético hasta el análisis de los productos resultantes, están evolucionando hacia procedimientos más rápidos y automatizados en un solo tubo. Estos avances se basan en el uso de equipos de PCR con detección espectrofluorimétrica con los que es posible realizar un seguimiento cuantitativo en tiempo real del proceso de amplificación del ADN (Brodmann y Moor, 2003).

La detección por PCR en tiempo real de los productos amplificados puede realizarse recurriendo a varios sistemas. Entre ellos destacan los basados en sondas TaqMan y los que emplean el reactivo SYBR Green. El SYBR Green es un fluorocromo que se intercala entre las hebras de la doble hélice de ADN permitiendo cuantificar la producción de amplicón generado en cada ciclo (Sawyer y col., 2003). En este trabajo se describe el desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real utilizando el agente intercalador fluorescente SYBR Green

para la detección cuantitativa de la presencia de carne de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus capreolus*) en mezclas cárnicas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Preparación de las muestras y extracción del ADN

Para los análisis realizados en este trabajo se ha utilizado tejido muscular procedente de las siguientes especies: ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*), corzo (*Capreolus capreolus*), rebeco (*Rupicapra rupicapra*), muflón (*Ovis ammon*), cabra montés (*Capra pyrenaica*), vaca (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*) y cabra (*Capra hircus*). Todos los ejemplares fueron identificados morfológicamente antes de la obtención de las muestras.

Para la detección cuantitativa de ciervo, gamo y corzo se prepararon tres baterías independientes de mezclas cárnicas binarias que contenían un 0,1, 1, 5, 10 y 25% de tejido muscular de cada especie diana en una matriz de tejido muscular de cerdo. Las mezclas binarias se analizaron crudas y tras someterse a un tratamiento térmico de esterilización (121 °C, 20 min).

La extracción del ADN a partir del tejido muscular se realizó utilizando el kit comercial de Promega Wizard® DNA Clean-up, de acuerdo al método descrito por Fajardo y col. (2006).

### 2. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores utilizados en este trabajo, se emplearon secuencias de los genes 12S y 18S ARNr de varias especies animales. En primer lugar, se diseñó una pareja de cebadores conservados en el gen mitocondrial 12S ARNr (12S-dir y 12S-inv) para la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 712 pb en ciervo, gamo, corzo, rebeco, muflón, cabra montés, cabra, vaca y oveja, tal y como se describe en un trabajo previo (Fajardo y col., 2007a). La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir del fragmento amplificado por los cebadores 12S-dir/12S-inv permitió el diseño de tres parejas de cebadores en zonas del gen 12S ARNr cuya secuencia incluía diferencias específicas de especie (sistemas de PCR específicos):

- a) *12SCEQFW* (5'-CAAAAACATATAACGAAAGTAACTTTCCGACC-3') y *12SCEQREV* (5'-AGTACTCTGGCGAATAGTTTTGTCTGCA-3') para la amplificación específica de ciervo;

- b) *12SDDQFW* (5'-TAAACAACGAAGGTAACCTTATCG-3') y *12SDDQREV* (5'-AAAGCACCGCCAAGTCCTT-3') para la amplificación específica de gamo;
- c) *12SCCQFW* (5'-GCGTAAAGCGTGTTAAAGCATAC-3') y *12SCCQREV* (5'-GCTATCGTGTTCAGCTATTTTCAA-3') para la amplificación específica de corzo.

Además, se diseñó otra pareja de cebadores universales en el gen nuclear 18S ARNr de varias especies de eucariotas (sistema de PCR endógeno): *18SEUDIR* (5'-TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGG-3') y *18SEUREV* (5'-TAATTTGCGCGCCTGCTG-3'). Estos cebadores se utilizaron como control endógeno para normalizar los valores obtenidos en las reacciones específicas de amplificación de ADN de ciervo, gamo y corzo.

### 3. Técnica de PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR se realizaron en una placa de 96 pocillos "Microamp® Optical/96-well Reaction Plate" utilizando el equipo 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con el siguiente programa: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, y de 1 min a 60 °C (corzo) o a 61 °C (ciervo y gamo). Cada reacción (20 µl) contenía 10 ng de ADN, la mezcla *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y los correspondientes cebadores específicos: 300nM (ciervo o gamo) o 900 nM (corzo). En idénticas condiciones y en paralelo se llevaron a cabo las reacciones de PCR del sistema endógeno, empleando 300 nM de los cebadores *18SEUDIR-18SEUINV*.

### 4. Análisis estadístico de los datos

La cuantificación de la presencia de ADN de ciervo, gamo y corzo en las mezclas cárnicas se llevó a cabo por el método de la cuantificación absoluta con relación a una recta estándar obtenida a partir de los valores de Ct de las mezclas cárnicas elaboradas con tejido muscular de cada especie diana en una matriz de cerdo. Los valores de Ct obtenidos en cada muestra (10 ng de ADN) con los correspondientes sistemas específicos de ciervo (CtCES), gamo (CtDDS) y corzo (CtCCS) se normalizaron de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$C_tCE = C_tEU * C_tCES / C_tEUS \text{ (para ciervo)}$$

$$C_tDD = C_tEU * C_tDDS / C_tEUS \text{ (para gamo)}$$

$$C_tCC = C_tEU * C_tCCS / C_tEUS \text{ (para corzo)}$$

donde:  $C_tCE$ ,  $C_tDD$  y  $C_tCC$ , son los  $C_t$  normalizados de las muestras en los sistemas específicos de ciervo, gamo y corzo, respectivamente;  $C_tEUS$  es el valor de  $C_t$  obtenido para

cada muestra y  $C_{tEU}$  es la media de los  $C_t$  obtenidos para cada recta estándar en el sistema endógeno. La concentración de ADN diana en una muestra problema se calcula interpolando el  $C_t$  normalizado obtenido en la correspondiente recta estándar de porcentajes conocidos de la especie diana en las mezclas.

Los valores de  $C_t$  normalizados se analizaron estadísticamente con el fin de evaluar la especificidad, sensibilidad y linealidad del ensayo.

## RESULTADOS

La cuantificación de la presencia de ADN de ciervo, gamo y corzo en mezclas cárnicas mediante PCR en tiempo real se realizó utilizando tres sistemas específicos que amplificaban, respectivamente, fragmentos de 134, 169 y 120 pb en el gen 12S ARNr. Como control endógeno para normalizar los valores obtenidos en los sistemas específicos, se empleó un cuarto sistema con cebadores universales de eucariotas que amplificaban un fragmento de 140 pb del gen 18S ARNr común a diversas especies animales.

En primer lugar, se evaluó la especificidad de los sistemas de PCR específicos de ciervo, gamo y corzo mediante el análisis de ADNs procedentes de diversas especies animales. Los sistemas específicos amplificaron los fragmentos esperados a partir del ADN de las especies diana con unos valores de  $C_t$  comprendidos entre 15,13 y 19,26, mientras que en el resto de especies los valores de  $C_t$  estuvieron comprendidos entre 33,37 y 35,43 (resultados no mostrados).

La **Figura 1** muestra los datos de fluorescencia obtenidos al analizar los distintos porcentajes de las especies diana en las mezclas cárnicas crudas de ciervo (**1a**), gamo (**1b**) y corzo (**1c**) en una matriz de carne de cerdo, con los correspondientes sistemas de PCR específicos. La fluorescencia registrada al analizar las mezclas binarias esterilizadas siguió un perfil similar (resultados no mostrados). Los datos de fluorescencia obtenidos al final de cada ciclo de amplificación para cada muestra con los sistemas de PCR específico y control endógeno, se analizaron estadísticamente siguiendo la metodología descrita por Camacho y col. (1993).

La **Figura 2** muestra los resultados de eficiencia obtenidos a partir de las rectas estándar elaboradas con 10 ng de ADN extraído de las mezclas cárnicas binarias crudas de ciervo, gamo y corzo. La pendiente obtenida al representar el logaritmo de las concentraciones de ADN frente a incremento de los valores de  $C_t$  tiene un valor de  $-3,34$  para el sistema específico de ciervo (**2a**),  $-3,42$  para el sistema específico de gamo (**2b**), y  $-3,25$  para el de corzo (**2c**), correspondiendo el valor cercano a  $-3,32$  a una eficiencia del 100%. Los datos de las pendientes al analizar las mezclas cárnicas esterilizadas de ciervo, gamo y corzo fueron de  $-4,2$ ,  $-3,4$  y  $-3,8$ , respectivamente (resultados no mostrados).

El límite de cuantificación obtenido al analizar las mezclas cárnicas crudas fue de  $0,001$ ;  $5,93 \times 10^{-0.5}$  y  $3,99 \times 10^{-0.5}$  % de ADN de ciervo, gamo y corzo, respectivamente. De igual modo, tras el análisis de las mezclas esterilizadas, los límites de cuantificación obtenidos fueron de  $0,8$ ;  $1,4 \times 10^{-0.3}$  y  $3,32 \times 10^{-0.4}$  % de ADN de ciervo, gamo y corzo, respectivamente.

La linealidad y sensibilidad de la técnica se evaluaron con relación al porcentaje de ciervo, gamo y corzo en mezclas cárnicas crudas (**Figura 2**) y esterilizadas (resultados no mostrados). Se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: Test de *Cochran*, análisis de regresión, análisis de varianza Lack of-Fit y capacidad discriminante.

## DISCUSIÓN

En los últimos años, la posibilidad de monitorizar en tiempo real el progreso de la reacción de PCR ha revolucionado las técnicas de cuantificación del ADN y del ARN (Brodmann y Moor, 2003). La técnica de PCR en tiempo real proporciona un resultado numérico en tiempo real que permite la cuantificación de las especies de interés y el tratamiento estadístico de los datos obtenidos. Este soporte ofrece un potencial cada vez mayor para la identificación y cuantificación de especies en los alimentos, ya que se acorta considerablemente el tiempo necesario para obtener resultados al no requerir el análisis electroforético de los productos amplificados. Además, al realizarse todo el proceso en el mismo tubo, se facilita la automatización y las posibilidades de contaminación con ADN exógeno se minimizan. (Laube y col., 2007). Su principio básico incluye el uso de diversos tipos de sondas fluorescentes (Taqman, "*molecular beacons*" o "*scorpions*") que hibridan

específicamente en la secuencia del ADN diana (Dooley *et al.*, 2004) o de moléculas como el SYBR Green, que detectan la presencia o ausencia de amplicones independientemente de su secuencia (López-Andreo y col., 2006). El SYBR Green es un agente intercalador fluorescente que sólo se detecta si está unido al ADN bicatenario. La ventaja de su empleo como marcador es que se puede incluir junto a los demás reactivos de la PCR y detectar los productos amplificados con una gran sensibilidad. El inconveniente es que tanto los amplicones específicos como los no específicos generan señal. Por ello, si se producen dímeros de cebadores o éstos se unen a una secuencia no diana, se generarán falsos positivos como consecuencia de la unión del marcador a los productos amplificados (Laube y col., 2007).

En trabajos anteriores, se han desarrollado técnicas de PCR cualitativas para la identificación específica de carnes procedentes de diversas especies de caza mayor (Fajardo y col., 2007a,b). El presente estudio aborda el desarrollo de una técnica de PCR cuantitativo en tiempo real para la cuantificación de ciervo (*Cervus elaphus*), gamo (*Dama dama*) y corzo (*Capreolus caprolus*) en mezclas cárnicas, basada en la amplificación de fragmentos especie-específicos del gen mitocondrial 12S ARN ribosómico. Se empleó el agente fluorescente inespecífico SYBR Green, con el fin de establecer una relación cuantitativa entre los valores de Ct obtenidos y el porcentaje de incorporación de carne de ciervo, gamo o corzo en mezclas cárnicas experimentales elaboradas en cerdo. Para normalizar los valores de Ct obtenidos se utilizó un sistema de control endógeno de eucariotas diseñado sobre el gen nuclear 18S ARNr.

La **Figura 2** muestra las rectas de calibrado obtenidas al analizar las mezclas cárnicas crudas de ciervo, gamo y corzo con los correspondientes sistemas específicos. El tratamiento estadístico de los datos obtenidos permitió la validación de los resultados a través del análisis de diferentes parámetros para evaluar la especificidad, linealidad y sensibilidad del método de cuantificación. De forma similar, se analizaron estadísticamente los resultados obtenidos con las mezclas cárnicas esterilizadas (no mostrados).

Los resultados obtenidos indican que el tipo de tratamiento térmico aplicado a la muestra influye en las ecuaciones de cuantificación de cada especie diana en las correspondientes mezclas cárnicas. En consecuencia, la cuantificación de especies en un

producto precisa de la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del tratamiento térmico de las muestras y del tipo de tejido analizado.

## CONCLUSIÓN

El empleo de la técnica de PCR en tiempo real para la identificación de especies animales constituye un trabajo pionero y de gran originalidad cuya implantación en los laboratorios de análisis permitirá, en un futuro próximo, desarrollar un gran número de aplicaciones en el análisis de los alimentos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Universidades de la Comunidad de Madrid (Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265) y por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (proyecto AGL 2004-00121). Violeta Fajardo y María Rojas disfrutaron de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia. Inés López-Calleja e Irene Martín disfrutaron de una beca de la Universidad Complutense de Madrid.

## BIBLIOGRAFÍA

Brodmann, PD y Moor D. Sensitive and semi-quantitative TaqMan real-time polymerase chain reaction system for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family *Mammalia* in food and feed. *Meat Sci.* 2003, 65:599-607.

Camacho, MA, Torres, AI, Gil-Alegre, ME, Obregón, MM y Ruiz. V. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Pratiques*, 1993, 3:197-202.

Cordella, C, Moussa, I, Martel, AC, Sbirrazzuoli, N y Lizzani-cuvelier I. Recent developments in food characterization and adulteration detection: Technique-oriented perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50:1751-1764.

Dooley, JJ, Paine, KE, Garret, SD y Brown HM. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Sci.* 2004, 68:431-438.

Fajardo, V, González, I, López-Calleja, I, Martín, I, Hernández, PE, García, T y Martín R. PCR-RLFP authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*) and goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54:1140-1150.

Fajardo, V, González, I, López-Calleja, I, Martín, I, Rojas, M, Hernández, PE, García, T y Martín R. Identification of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) using polymerase chain reaction targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci.* 2007a, 76:234-240.

Fajardo, V, González, I, López-Calleja, I, Martín, I, Rojas, M, Hernández, PE, García, T y Martín R. PCR identification of meats from chamois (*Rupicapra rupicapra*), pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) and mouflon (*Ovis ammon*) targeting specific sequences from the mitochondrial d-loop. *Meat Sci.* 2007b, 76:644-652.

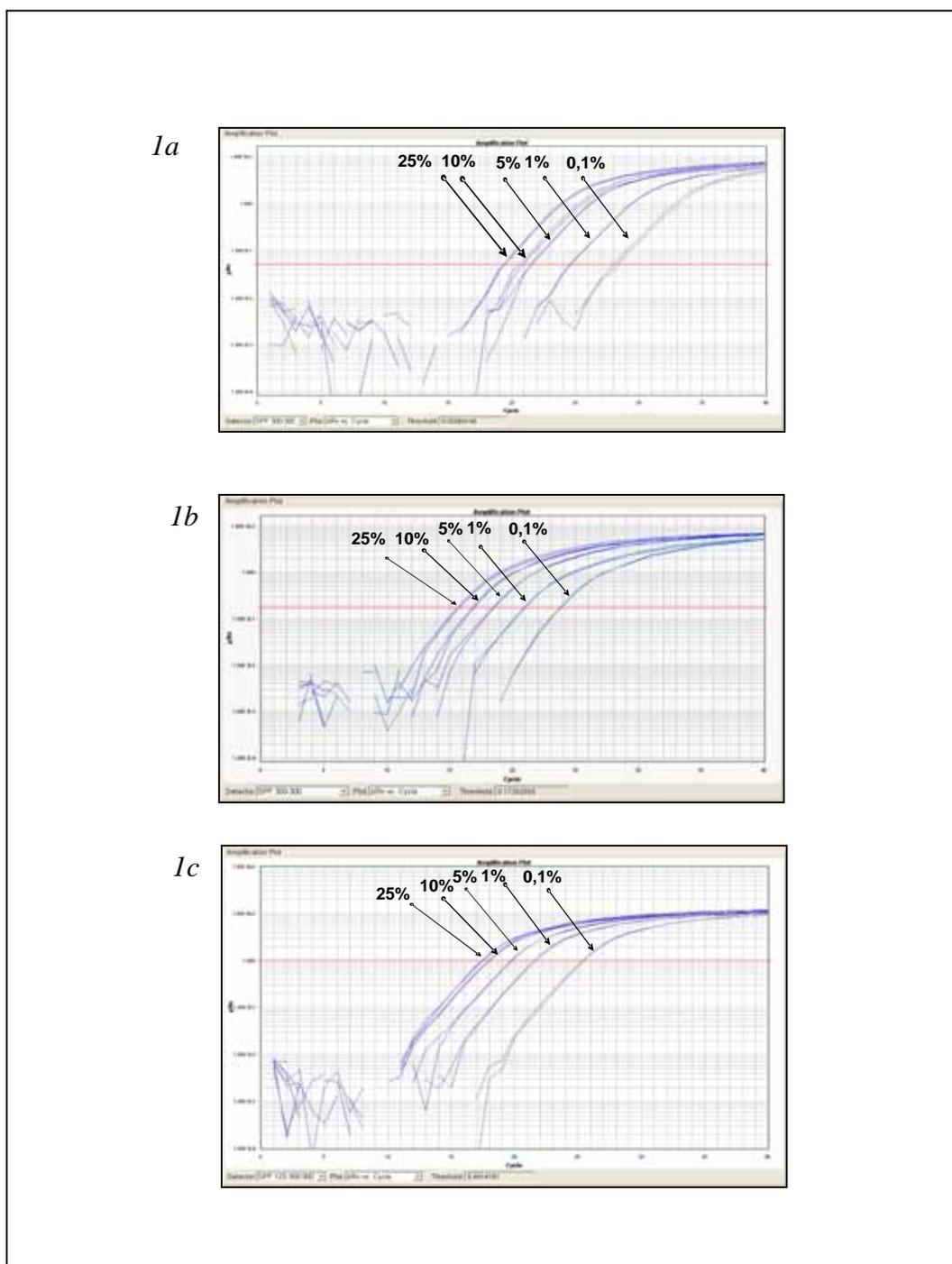
Laube, I, Zagon, J y Broll, H. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2007, 42:336-341.

López-Andreo, M, Garrido-Pertierra, A y Puyet A. Evaluation of post-polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54:7973-7978.

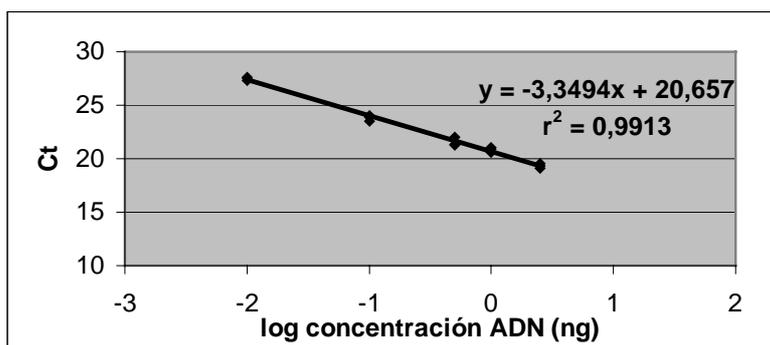
Matsunaga, T, Chikuni, K, Tanabe, R, Muroya, S, Nakai, H, Shibata, K, Yamada, J y Shinmura Y. Determination of mitochondrial cytochrome b gene sequence for red deer (*Cervus elaphus*) and the differentiation of closely related deer meats. *Meat Sci.* 1998, 49:379-385.

Partis, L, Croan, D, Guo, Z, Clark, R, Coldham, T y Murby J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. *Meat Sci.* 2000, 54:369-376.

Sawyer, J, Wood, C, Shanahan, D, Gout, S y McDowell D. Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 2003, 14:579-583.



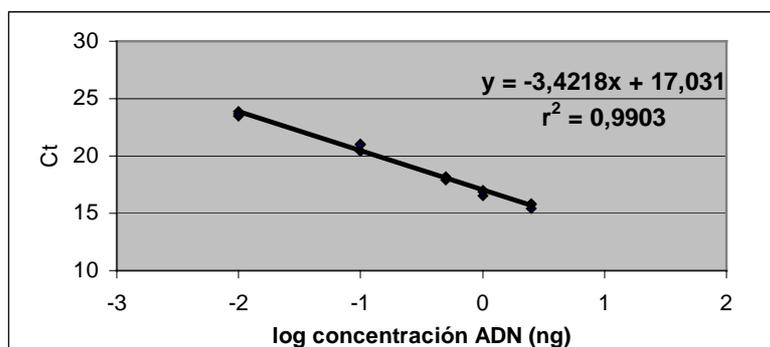
**Figura 1.** Representación de la fluorescencia emitida frente al ciclo de amplificación, al analizar por duplicado mezclas experimentales crudas de carne de ciervo, gamo y corzo (25, 10, 1 y 0,1%) en una matriz de carne de cerdo con los sistemas de PCR en tiempo real específico de ciervo (**1a**), gamo (**1b**) y corzo (**1c**).



Número de muestras total	15
"C" Cochran	0.4303*
S <sup>2</sup> combinada	0.0736
ANOVA test "F" reression (1)	1483.2**
ANOVA test "F" Lack-of-Fit (2)	1.42**
Capacidad discriminante	0.06*

**2a**  
**Mezcla cruda de carne de ciervo en carne de cerdo**

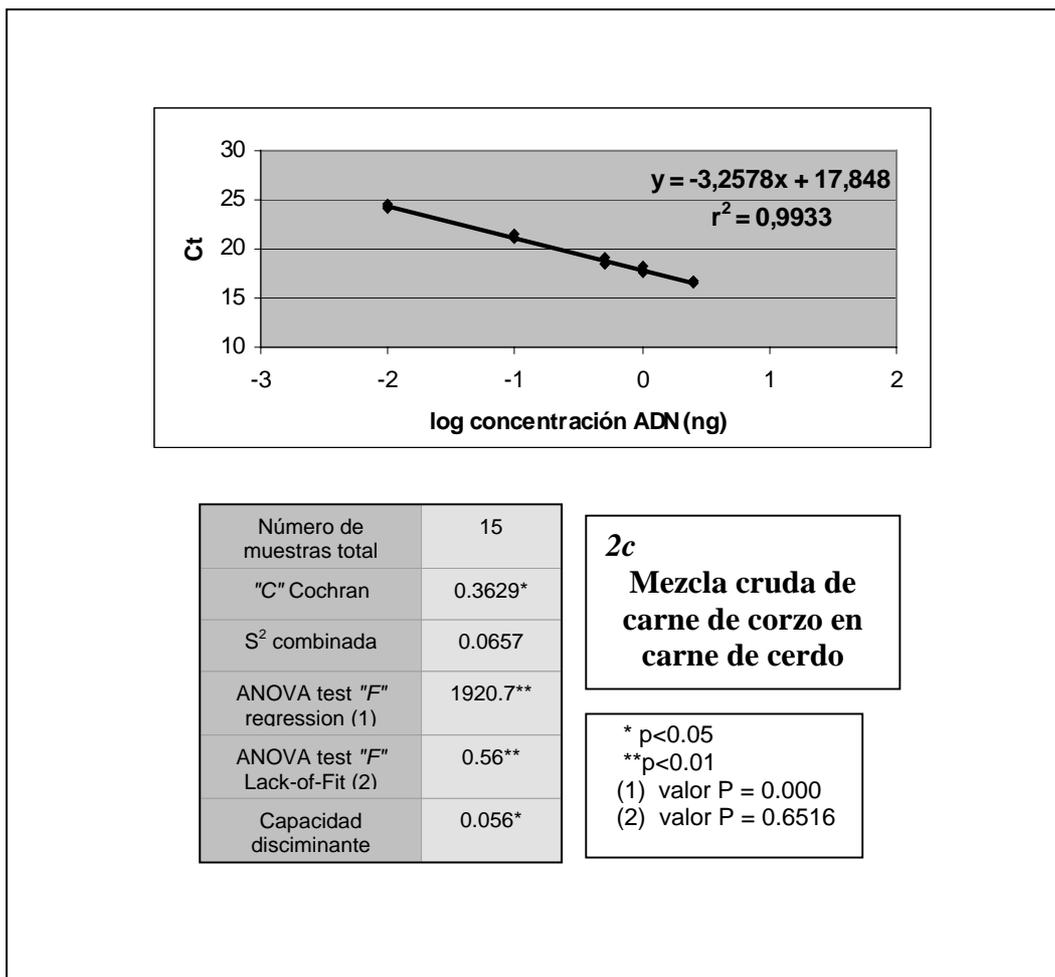
\* p<0.05  
\*\*p<0.01  
(1) valor P = 0.000  
(2) valor P = 0.2928



Número de muestras total	15
"C" Cochran	0.2264*
S <sup>2</sup> combinada	0.0671
ANOVA test "F" reression (1)	1331.13**
ANOVA test "F" Lack-of-Fit (2)	3.50**
Capacidad discriminante	0.054*

**2b**  
**Mezcla cruda de carne de gamo en carne de cerdo**

\* p<0.05  
\*\*p<0.01  
(1) valor P = 0.000  
(2) valor P = 0.0574



**Figura 2.** Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real desarrollado para la cuantificación de ciervo (**2a**), gamagrass (**2b**) y corzo (**2c**), utilizando mezclas experimentales de cada especie diana (25, 10, 1 y 0,1%) en una matriz de carne de cerdo.