

PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DE ADN BOVINO EN PIENSOS VEGETALES

Irene Marín de la Torre

Tutores: Teresa García, Isabel González y Rosario Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

RESUMEN

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de PCR en tiempo real, empleando el agente intercalador fluorescente SYBR® Green, para llevar a cabo la detección y cuantificación de tejidos bovinos en alimentos y piensos. El método combina el uso de cebadores específicos de vaca que amplifican un fragmento de 84 pb del gen mitocondrial 12S ARNr junto a cebadores universales que se emplean como control endógeno y amplifican un fragmento de 140 pb en el ADN de las especies eucariotas. La especificidad de los cebadores se probó frente a 18 especies animales y 6 especies vegetales. La técnica desarrollada permitió detectar y cuantificar hasta un 0,1% de ADN bovino en mezclas experimentales de vaca/avena. La sensibilidad del ensayo no se alteró al analizar muestras sometidas a tratamientos térmicos intensos (133°C/20 min/300 kPa).

SUMMARY

A real-time polymerase chain reaction (PCR) approach using SYBR green detection system has been developed for the quantitative detection of bovine tissues in feedstuffs and food. The method combines the use of bovine-specific primers, that amplify a 84 bp fragment of the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene, and universal primers that amplify a 140 bp fragment of the nuclear 18S ribosomal RNA gene from eukaryotic DNA. The 18S rRNA primers are used as endogenous control for the total content of PCR-amplifiable DNA in the sample. The specificity of the primers was tested against 18 animal species including mammals, birds and fish, as well as 6 plant species. Analysis of experimental bovine tissues/oats mixtures demonstrated the suitability of the assay for the detection of bovine DNA in mixtures containing as low as 0.1% of bovine tissues. The performance of the method was not affected by severe heat treatment (up to 133°C for 20 min at 300 kPa).

Palabras clave: PCR en tiempo real; SYBRGreen; cuantificación de ADN bovino; 12S y 18S ARNr; piensos

INTRODUCCIÓN

La identificación del origen de las distintas materias primas que integran los piensos y otros productos alimenticios tiene una gran importancia para garantizar su trazabilidad. El Reglamento (CE) nº 178/2002 (Parlamento Europeo, 2002) establece desde enero de 2005 la obligatoriedad de que todas las empresas alimentarias y de piensos dispongan de un sistema de trazabilidad que permita garantizar la seguridad de los productos comercializados. Además, la prohibición de la Unión Europea de alimentar a rumiantes y otros animales de abasto con proteínas derivadas de animales, como medida preventiva para evitar la propagación de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (Comisión de las Comunidades Europeas, 2002), ha potenciado la búsqueda y desarrollo de técnicas analíticas que permitan la detección e identificación de tejidos animales en piensos.

En la actualidad, entre los métodos empleados para la identificación de especies animales en alimentos y piensos destacan las técnicas inmunológicas y genéticas. Los intensos tratamientos térmicos a los que se someten las harinas de carne y hueso desnaturalizan las proteínas y, en consecuencia, dificultan la utilización de técnicas inmunoenzimáticas al disminuir la probabilidad de que los anticuerpos reconozcan epítomos específicos (Hossner *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). Por el contrario, las técnicas genéticas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son rápidas, eficaces, y permiten la identificación de especies en cualquier producto alimenticio sin que los resultados se vean afectados por el tratamiento térmico. Estas características convierten a la técnica de PCR en el método más utilizado para la identificación de tejidos animales en alimentos y piensos (Bottero *et al.*, 2003; Kusama *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004). Los sistemas de PCR en tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de la secuencia diana a medida que se produce, en lugar de medir la cantidad de producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos. De esta forma es posible realizar la cuantificación del ADN de una forma más exacta y reproducible.

Para el desarrollo de técnicas de PCR en tiempo real se pueden emplear moléculas fluorescentes específicas de secuencia (sondas Taqman, sondas FRET, etc) o intercaladores fluorescentes no específicos de secuencia (SYBRGreen). SYBR® Green es una molécula que se une al surco menor del ADN pero no al ADN de cadena sencilla, y permite cuantificar la producción de amplicón generado.

La ventaja de emplear como marcador este tipo de moléculas es que se puede incluir junto a los demás reactivos de la reacción de PCR y detectar cualquier producto amplificado, independientemente de su secuencia. Los inconvenientes son que tanto los productos específicos como los no específicos generan señal y que no es posible detectar simultáneamente varias reacciones de amplificación distintas en el mismo tubo.

El objetivo de este trabajo de investigación ha consistido en el desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real, basada en la utilización de cebadores específicos y SYBRGreen, para la detección y cuantificación de ADN bovino en piensos de origen vegetal.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección de las muestras

Las muestras de tejido muscular y graso de vaca se obtuvieron de mataderos ubicados en la Comunidad de Madrid. Las materias primas vegetales se adquirieron en comercios minoristas de Madrid.

2. Extracción de ADN

El ADN de las muestras se extrajo según el método descrito por Martín *et al.*, (2007).

3. Diseño de cebadores especie-específicos

Las secuencias de los genes 12S ARNr y 18S ARNr de distintas especies animales y vegetales, disponibles en la base de datos EMBL, se compararon empleando el programa “emma” del paquete informático EMBOSS. A continuación, con la ayuda del programa Primer Express 2.0 (Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA), se diseñaron las siguientes parejas de cebadores:

a) Los cebadores *12SpVACADIR* (TTAGTTGAATTAGGCCATGAAGCA) y *12SpVACAINV* (GTTTAAATAGGGTTAAGATGCACTCAATC) para la amplificación específica de un fragmento de 84 pb del gen mitocondrial 12S ARNr a partir de ADN bovino.

b) Los cebadores *18SpEUDIR* (TCTGCCCTATCAACTTTTCGATGG) y *18SpEUINV* (TAATTTGCGCGCCTGCTG) para la amplificación de un fragmento 140 pb del gen nuclear 18S ARNr en el ADN de cualquier organismo eucariota. Esta segunda reacción se empleó como control endógeno con el fin de normalizar los valores obtenidos en la reacción anterior.

4. PCR en tiempo real

La amplificación de los fragmentos seleccionados se realizó en un equipo SDS 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en un volumen total de reacción de 20 µl, con el siguiente programa de amplificación: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, y 1 min a 61 °C. Se emplearon 10 ng de ADN, 300 nM del cebador directo (*12SpVACADIR*) y 900 nM del inverso (*12SpVACAINV*) en el sistema específico, mientras que para el sistema endógeno se empleó 300 nM de cada cebador (*18SpEUDIR-18SpEUINV*) y 10 ng de ADN. Para la detección de los fragmentos se empleó el agente intercalador fluorescente SYBR® Green (Applied Biosystems).

5. Análisis de datos

Para la cuantificación del ADN bovino en las muestras se empleó el método de cuantificación relativa, mediante la comparación del valor de ciclo umbral (C_t) obtenido con los cebadores específicos de vaca con el valor de C_t obtenido para el control endógeno, y se expresó como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (comparative C_t method, User Bulletin #2, ABI Prism 7700 SDS, Applied Biosystems). El C_t es la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia generada por el SYBRGreen sobrepasa la línea umbral.

La validación del método se realizó analizando diluciones seriadas de ADN y mezclas experimentales de tejidos bovinos con avena. Para ello se prepararon mezclas binarias, crudas y sometidas a un tratamiento térmico de 133°C/20 min/3 bares de presión que contenían un 100, 10, 1 y un 0,1% de tejido muscular o de tejido graso de vaca en una matriz vegetal de avena.

RESULTADOS

La especificidad de la técnica de PCR en tiempo real desarrollada se evaluó mediante el análisis de ADN procedente de un elevado número de especies animales y vegetales. El sistema específico de vaca amplificó un fragmento de 84 pb a partir del ADN de vaca ($C_t = 17,23 \pm 0,09$) con una temperatura de disociación (T_m) entre 78,5 y 79°C, pero no produjo amplificación a partir del ADN de otras especies (C_t entre 31,96 y 38,49) confirmando la especificidad del método. El sistema universal de eucariotas (control endógeno) amplificó un fragmento de 140 pb en el ADN de todas las especies analizadas ($C_t = 16,07 \pm 1,10$) con una T_m entre 83 y 84°C (Tabla 1).

Mediante el análisis de mezclas experimentales de vaca/avena se evaluó la linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud del método de cuantificación.

El límite de cuantificación para la curva de calibrado preparada con diluciones de ADN a partir de 10 ng de muestra, se calculó como la cantidad de ADN estimada para un C_t de 30,52 (media menos dos veces la desviación estándar de los controles negativos y las especies no diana) y fue de 0,006 ng, que corresponde a 0,06% de ADN bovino. El límite de cuantificación en las mezclas experimentales fue de 0,1-0,7% en función del tipo de tejido y del tratamiento térmico al que se sometieron las muestras: 0,02 ng para el tejido muscular crudo (Figura 1A), 0,07 ng para el tejido muscular tratado térmicamente (Figura 1B), 0,01 ng para el tejido graso crudo (Figura 1C) y 0,05 ng para la grasa tratada térmicamente (Figura 1D), lo que corresponde a 0,2, 0,7, 0,1, y 0,5% de ADN bovino, respectivamente.

DISCUSIÓN

La técnica de PCR en tiempo real desarrollada en este trabajo permite la detección cuantitativa de pequeñas cantidades de ADN bovino (entre 0,1 y 10%) en mezclas experimentales incluso si estas se han sometido a tratamientos térmicos muy intensos. No obstante, los resultados obtenidos indican que el tipo de tratamiento térmico de la muestra influye en las ecuaciones de cuantificación del porcentaje de la especie diana. En consecuencia,

la cuantificación requiere la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del tratamiento térmico de las muestras.

La metodología de PCR en tiempo real propuesta, que emplea cebadores específicos de vacuno y cebadores universales de organismos eucariotas, constituye una herramienta rápida, sensible y fiable que tiene un gran interés para el control de la presencia de tejidos bovinos en alimentos procesados y piensos. Su utilización puede contribuir a garantizar el cumplimiento de las normas de la Unión Europea y evitar prácticas fraudulentas en la elaboración de estos productos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra Esther Gil Alegre de la Facultad de Farmacia (UCM) la ayuda prestada para la validación del método analítico y a Rosa María Pérez Díaz del Centro de Genómica y Proteómica de la Facultad de Biología (UCM), su colaboración en el manejo del equipo de PCR en tiempo real SDS 7700.

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Universidades e Investigación de la Comunidad de Madrid, proyecto Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265. Irene Martín disfruta de una beca de la Universidad Complutense de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

Bottero, M. T., Dalmaso, A. Nucera, D. Turi, R. M. Rosati, S. Squadrone, S. Gorla, M. Y Civera, T. 2003. Development of a PCR assay for the detection of animal tissues in ruminant feeds. *J. Food Prot.* 66:2307-2312.

COMISION DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. (2002). Decisión de la Comisión 2002/248/CE de 27 de marzo de 2002 por la que se modifica la Decisión 2000/766/CE del Consejo y la Decisión 2001/9/CE de la Comisión con respecto a las encefalopatías espongiformes transmisibles y la utilización de proteínas animales en la alimentación animal. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L 84: 71-72.

Hossner, K. L., Yemm, R. S. Sonnenshein, S. E. Mason, G. L. Cumming, B. A. Reddy, M. C. S. Sofos, J. N. Scanga, J. A. Tatum, J. D. Smith, G. C. Y Belk, K. E. 2006. Comparison of immunochemical (enzyme-linked immunosorbent assay) and immunohistochemical methods for the detection of central nervous system tissue in meat products. *J. Food Prot.* 69: 644-650.

Kim, S.-H., Huang, T.-S. Seymour, T. A. Wei, C.-I. Kempf, S. C. Brigman, C. R. Clemens, R. A. Y An, H. 2004. Identification of biomarker for the detection of prohibited meat and bone meal residues in animal feed. *J. Food Sci.* 69: 739-745.

Kusama, T., Nomura, T. y Kadowaki, K. 2004. Developed of primers for detection of meat and bone meal in ruminant feed and identification of animal origin. *J. Food Prot.* 67: 1289-1292.

Martín, I., García, T. Fajardo, V. López-Calleja, I. Hernández, P. E. González, I. y Martín, R. 2007. Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Sci.* 75:120-127.

PARLAMENTO EUROPEO. (2002). Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002 por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L 031: 1-24.

Rodríguez, M. A., García, T. González, I. Asensio, L. Hernández, P. E. y Martín, R. 2004. PCR identification of beef, sheep, goat and pork in raw and heat treated meat mixtures. *J. Food Prot.* 67: 172-177.

TABLA 1. Especificidad de los sistemas de PCR en tiempo real (valores de Ct obtenidos a partir de 10 ng ADN).

Nombre común	Nombre científico	SISTEMA ESPECÍFICO	SISTEMA ENDÓGENO
Vaca	<i>Bos taurus</i>	17.23±0.09	16.63±0.11
Oveja	<i>Ovis aries</i>	33.24±1.56	16.83±0.82
Cabra	<i>Capra hircus</i>	35.28±1.25	17.50±0.47
Cerdo	<i>Sus scrofa domestica</i>	33.04±1.99	15.56±1.12
Pollo	<i>Gallus gallus</i>	34.66±2.56	16.76±0.59
Pavo	<i>Meleagris gallipavo</i>	34.63±0.38	15.23±0.56
Pato	<i>Anas platyrhynchos x Cairina muschata</i>	35.89±0.47	15.18±0.70
Oca	<i>Anser anser</i>	34.80±0.83	15.87±0.75
Caballo	<i>Equus caballus</i>	35.01±3.88	17.32±3.85
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	35.62±1.40	18.31±3.50
Gato	<i>Felis catus</i>	36.03±1.51	18.42±0.60
Perro	<i>Canis familiaris</i>	34.90±0.65	15.58±0.77
Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	35.49±0.87	16.87±0.62
Boquerón	<i>Engraulis encrasicolus</i>	35.23±1.23	16.37±0.81
Salmón	<i>Salmo salar</i>	37.25±1.61	15.01±0.05
Merluza	<i>Merluccius spp</i>	38.49±1.30	14.94±0.11
Mero	<i>Epinephelus marginatus</i>	33.68±0.97	14.25±0.09
Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>	35.10±1.58	16.11±0.78
Atún	<i>Thunnus spp</i>	33.47±0.60	15.93±0.26
Centeno	<i>Hordeum vulgare</i>	31.96±0.43	16.03±0.55
Maíz	<i>Zea mays</i>	32.10±0.16	14.60±0.57
Avena	<i>Avena sativa</i>	36.71±2.61	16.75±0.57
Soja	<i>Glycine max</i>	35.75±2.09	15.57±0.44
Cebada	<i>Secale cereale</i>	33.20±0.54	15.58±0.61
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	34.16±0.81	14.61±0.12

FIGURA 1. Análisis de la linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud del método de cuantificación de ADN bovino en mezclas experimentales vaca/avena que contienen un 100, 10, 1 y 0,1% de tejidos de vacuno. 1A) tejido muscular crudo. 1B) tejido muscular tratado térmicamente (133°C, 300 kPa for 20 min). 1C) tejido graso crudo. 1D) tejido graso tratado térmicamente (133°C, 300 kPa for 20 min). * p<0.05; **p<0.01.

