

**IDENTIFICACIÓN DE CARNES PROCEDENTES DE AVES DE CAZA Y DE LA  
AVICULTURA ALTERNATIVA MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO  
REAL**

**IDENTIFICATION OF MEATS FROM GAME BIRDS AND ALTERNATIVE POULTRY  
FARMING BY REAL-TIME PCR TECHNIQUE**

**María Rojas Diéguez, Isabel González Alonso y Rosario Martín de Santos**

**Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Fac. de Veterinaria. UCM**

**RESUMEN:**

En este trabajo se ha desarrollado una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real empleando sondas TaqMan, para la identificación de carnes procedentes de codorniz (*Coturnix coturnix*), faisán (*Phasianus colchicus*), perdiz (*Alectoris spp*), pintada (*Numida meleagris*), paloma (*Columba spp*), becada (*Scolopax rusticola*) y zorzal (*Turdus philomelos*). El método combina el uso de cebadores y sondas TaqMan especie-específicos que amplifican fragmentos de pequeño tamaño (<200 pb) del gen mitocondrial 12S ARNr y una pareja de cebadores endógenos que amplifican un fragmento conservado de 141 pb del gen nuclear 18S ARNr a partir del ADN de especies eucariotas. La técnica desarrollada permitió llevar a cabo la detección del ADN de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal tanto en mezclas cárnicas experimentales crudas y esterilizadas así como en diversos productos comerciales que contenían carne de las especies diana.

*Palabras clave:* aves de caza, 12S ARNr, 18S ARNr, PCR en tiempo real, sondas TaqMan

**ABSTRACT:**

Real-time polymerase chain reaction (PCR) based on TaqMan probes has been applied to the identification of meat from quail (*Coturnix coturnix*), pheasant (*Phasianus colchicus*), partridge (*Alectoris spp*), guinea fowl (*Numida meleagris*), pigeon (*Columba spp*), Eurasian woodcock (*Scolopax rusticola*), and song thrush (*Turdus philomelos*). The method combines the use of species-specific primers and TaqMan probes that amplify small fragments (<200 base pairs) of the mitochondrial 12S rRNA gene, and an endogenous control primer pair that amplifies a 141 bp fragment of the nuclear 18S rRNA gene from eukaryotic DNA. Analysis of

experimental raw and heat-treated binary mixtures as well as of commercial meat products from the target species, demonstrated the suitability of the assay for the detection of the target DNAs.

*Key words:* game birds, 12S rRNA gene, 18S rRNA gene, real-time PCR, TaqMan probes

## **INTRODUCCIÓN:**

En España el consumo de carne y productos cárnicos procedentes de las aves de caza ha aumentado de forma notable en los últimos años, debido en parte al auge de explotaciones de avicultura alternativa dedicadas a la cría intensiva de especies como la codorniz, el faisán, o la perdiz (MAPA, 2005). Sin embargo, dado que estas especies alcanzan precios elevados en el mercado, es frecuente que se sustituyan de forma fraudulenta por otras de menor valor comercial y organoléptico (Wolf *et al.*, 1999). Este hecho justifica la necesidad de disponer de métodos que permitan la adecuada autenticación de las carnes y productos cárnicos comercializados, sobre todo en productos picados, deshuesados, escabechados, etc., donde desaparecen las características morfológicas que facilitan su identificación.

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 específicas para llevar a cabo la diferenciación de especies animales (Lenstra *et al.*, 2001). En los últimos años las técnicas de PCR han evolucionado hacia procedimientos más rápidos y automatizados, entre los que destacan los sistemas de PCR en tiempo real (Zhang *et al.*, 2007). En estos sistemas los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial mediante el empleo de compuestos fluorescentes (Costa, 2004).

Entre las moléculas fluorescentes más empleadas en los sistemas de PCR en tiempo real destacan las sondas TaqMan. Estas sondas son oligonucleótidos marcados con fluorocromos en los dos extremos que se unen específicamente a la secuencia diana delimitada por los cebadores, provocando de este modo un aumento de fluorescencia directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado. La detección por fluorescencia elimina la necesidad de llevar a cabo manipulaciones adicionales como la electroforesis en geles de agarosa y la tinción con bromuro de etidio del ADN amplificado, facilitando un análisis más rápido y seguro de las muestras y la automatización de la técnica a gran escala (López-Calleja *et al.*, 2007).

En este trabajo se describe el desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan para la detección de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal en

carnes y productos cárnicos. La técnica está basada en la amplificación de fragmentos específicos del gen 12S ARN ribosómico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS:**

### **1. Selección y extracción del ADN de muestras cárnicas**

Se utilizaron muestras de tejido muscular procedente de codorniz (*Coturnix coturnix*), faisán (*Phasianus colchicus*), perdiz roja (*Alectoris rufa*), perdiz chukar (*Alectoris chukar*), perdiz moruna (*Alectoris barbara*), pintada (*Numida meleagris*), paloma común (*Columba livia*), paloma torcaz (*Columba palumbus*), becada (*Scolopax rusticola*) y zorzal (*Turdus philomelos*). Estas muestras se analizaron crudas y después de someterse a un tratamiento térmico de esterilización (121 °C, 20 minutos). Para determinar la especificidad de los cebadores se emplearon muestras de tejido muscular procedente de varias especies de aves y mamíferos de caza y domésticos. Todos los ejemplares fueron identificados morfológicamente antes del procesado de las muestras.

Para la detección cuantitativa de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal se elaboraron mezclas cárnicas binarias que contenían un 50, 25, 10, 5, 1 y 0,1% de tejido muscular de cada especie diana en una matriz de tejido muscular de pollo. Las mezclas binarias se analizaron crudas y tras someterse a un tratamiento térmico de esterilización (121 °C, 20 min). Por otra parte, se analizaron diversos productos comerciales (productos congelados, refrigerados, picados, escabechados, estofados, patés, etc.) que contenían carne de las especies diana.

El ADN de las muestras analizadas se extrajo utilizando el kit comercial Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-up de Promega, de acuerdo al método descrito por Rojas *et al.* (2008).

### **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 en el gen mitocondrial 12S ARNr (12SEQDIR-12SEQINV) para la amplificación de un fragmento conservado de ADN de aproximadamente 720 pb (Rojas *et al.*, 2008). La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir del fragmento amplificado por los cebadores 12SEQDIR-12SEQINV permitió el diseño de siete parejas de cebadores en zonas del gen 12S ARNr cuya secuencia incluía diferencias específicas de especie: 12SCODIR-12SCOINV, 12SFAISDIR-12SFAISINV, 12SPERDIR-12SPERINV, 12SPINTDIR-

12SPINTINV, 12SPALDIR-12SPALINV, 12SBECDIR-12SBECINV y 12SZORDIR-12SZORINV para la amplificación específica de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal, respectivamente. Debido al alto grado de similitud entre las secuencias obtenidas, el diseño de los cebadores específicos sólo se pudo llevar a cabo en determinadas zonas de la secuencia. La distinta posición de los cebadores específicos diseñados condicionó el posterior diseño de sondas TaqMan. De este modo, se diseñaron sondas TaqMan especie-específicas para la detección de codorniz (CODTM), faisán (FAITM), becada (BECTM) y zorzal (ZORTM). En cambio, la similitud en la posición de los cebadores específicos de perdiz, pintada y paloma, permitió el diseño de una sonda común para las tres especies (AVESTM).

Además, a partir de secuencias del gen 18S ARNr de varias especies de aves y mamíferos disponibles en la base de datos NCBI se diseñó la pareja de cebadores conservados 18SEUDIR-18SEUINV y la sonda 18SPROBE. Este sistema se utilizó como control positivo de amplificación y como control endógeno para normalizar los valores obtenidos en las reacciones específicas de amplificación de ADN de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal.

### **3. Técnica de PCR en tiempo real**

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos capilares de vidrio utilizando el equipo LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche Applied Science, Pensberg, Germany) con el siguiente programa: 10 min a 95°C, 35 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a 65°C (codorniz, perdiz, pintada y becada), 63°C (paloma y zorzal), o 60°C (faisán), y 1 s a 72°C. Cada reacción (10 µl) contenía 5 ng de ADN, la mezcla LightCycler<sup>®</sup> TaqMan<sup>®</sup> Master (Roche Applied Science), 2 pmol de sonda TaqMan y los correspondientes cebadores específicos: 300/900 nM (codorniz, perdiz, pintada y zorzal), 300/300 nM (becada), o 900/900 nM (faisán y paloma). En idénticas condiciones y en paralelo se llevaron a cabo las reacciones de PCR del control endógeno, empleando 300/900 nM de los cebadores 18SEUDIR-18SEUINV y 2 pm de la sonda 18SPROBE. El punto de corte o *crossing point* ( $C_p$ ), que corresponde a la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia generada por la sonda TaqMan sobrepasa la línea umbral, se calculó automáticamente mediante el software LightCycler<sup>®</sup> como el primer máximo de la segunda derivada de la curva.

### **4. Análisis de los datos**

La capacidad de cuantificación de la técnica se evaluó con relación a una recta estándar obtenida a partir de los valores de  $C_p$  de mezclas cárnicas crudas y esterilizadas que contenían un

50, 25, 10, 5, 1 y 0,1% de tejido muscular de cada especie diana en una matriz de pollo. Los valores de  $C_p$  obtenidos en cada muestra (5 ng de ADN) con los correspondientes sistemas especie-específicos de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada o zorzal ( $C_pEsS$ ) se normalizaron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$C_pEsS = C_pEU * C_pEs / C_pEUS$$

donde:  $C_pEs$  es el valor de  $C_p$  de las muestras en el sistema específico correspondiente;  $C_pEUS$  es el valor de  $C_p$  obtenido para cada muestra en el sistema endógeno y  $C_pEU$  es la media de los  $C_p$  obtenidos para cada recta estándar en el sistema endógeno. La concentración de ADN diana en una muestra problema se calcula interpolando el  $C_p$  normalizado obtenido, en la correspondiente recta estándar de porcentajes conocidos de la especie diana en las mezclas.

Los valores de  $C_p$  normalizados se analizaron estadísticamente de acuerdo al método descrito por Camacho *et al.* (1993), con el fin de evaluar la especificidad, linealidad, sensibilidad, exactitud y precisión del ensayo. Para ello se aplicaron las siguientes pruebas estadísticas: Test de Cochran, análisis de regresión, análisis de varianza Lack-of-Fit, capacidad discriminante, y Test de *t-Student*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

La especificidad de los cebadores diseñados se determinó frente a ADNs procedentes de otras especies. Los cebadores permitieron la amplificación del fragmento específico únicamente en las muestras que contenían el ADN de la especie diana con unos valores de  $C_p$  comprendidos entre 16,03 y 20,39, mientras que en el resto de especies no se detectó fluorescencia después de 35 ciclos de amplificación. Los cebadores conservados 18SEUDIR-18SEUINV amplificaron el fragmento de 141 pb del gen 18S rRNA en todas las especies analizadas (Tabla 1).

Los datos de fluorescencia obtenidos al final de cada ciclo de amplificación en cada muestra con los sistemas de PCR específico y control endógeno, se analizaron estadísticamente siguiendo la metodología descrita por Camacho *et al.* (1993). En primer lugar, se evaluó la eficiencia de la técnica mediante el análisis de mezclas binarias que contenían un 50, 25, 10, 5, 1 y 0,1% de cada especie diana en carne de pollo. Como se observa en la Figura 1, la pendiente obtenida al representar el logaritmo de las concentraciones de ADN frente al incremento de los valores de  $C_p$  tiene en todas las especies un valor cercano a -3,32 que corresponde a una eficiencia del 100%. Los datos de las pendientes al analizar las mezclas cárnicas esterilizadas de

codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal fueron de -3,24, -3,34, -3,28, -3,15, -3,03, -4,42 y -3,17, respectivamente (resultados no mostrados).

**TABLA 1**

Especificidad de los sistemas de PCR en tiempo real de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal (valores de  $C_p$  obtenidos a partir de 5 ng de ADN)

Especie	Sistema específico de codorniz	Sistema específico de faisán	Sistema específico de perdiz	Sistema específico de pintada	Sistema específico de paloma	Sistema específico de becada	Sistema específico de zorzal	Sistema endógeno
Codorniz ( <i>Coturnix coturnix</i> )	20,39 ± 0,19	35	35	35	35	35	35	+
Faisán ( <i>Phasianus colchicus</i> )	35	17,10 ± 0,04	35	35	35	35	35	+
Perdiz roja ( <i>Alectoris rufa</i> )	35	35	19,14 ± 0,06	35	35	35	35	+
Perdiz chukar ( <i>Alectoris chukar</i> )	35	35	19,23 ± 0,08	35	35	35	35	+
Perdiz moruna ( <i>Alectoris barbara</i> )	35	35	19,19 ± 0,10	35	35	35	35	+
Pintada ( <i>Numida meleagris</i> )	35	35	35	16,15 ± 0,04	35	35	35	+
Paloma común ( <i>Columba livia</i> )	35	35	35	35	16,32 ± 0,07	35	35	+
Paloma torcaz ( <i>Columba palumbus</i> )	35	35	35	35	16,40 ± 0,04	35	35	+
Becada ( <i>Scolopax rusticola</i> )	35	35	35	35	35	19,52 ± 0,06	35	+
Zorzal ( <i>Turdus philomelas</i> )	35	35	35	35	35	35	16,03 ± 0,08	+
Urogallo ( <i>Tetrao urogallus</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Pollo ( <i>Gallus gallus</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Pavo ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Pato de berbería ( <i>Cairina moschata</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Oca ( <i>Anser anser</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Vaca ( <i>Bos taurus</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Oveja ( <i>Ovis aries</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Cabra ( <i>Capra hircus</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Cerdo ( <i>Sus scrofa dom.</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Gamo ( <i>Dama dama</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Corzo ( <i>Capreolus capreolus</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Ciervo ( <i>Cervus elaphus</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Rebeco ( <i>Rupicapra rupicapra</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Muflón ( <i>Ovis ammon</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+
Cabra pirenaica ( <i>Capra pyrenaica</i> )	35	35	35	35	35	35	35	+

Valores medios de  $C_p$  ± DS de cada reacción por duplicado

Un valor  $C_p$  de 35 indica que no hay amplificación del producto de PCR después de 35 ciclos

+ indica amplificación del producto de PCR con el sistema endógeno

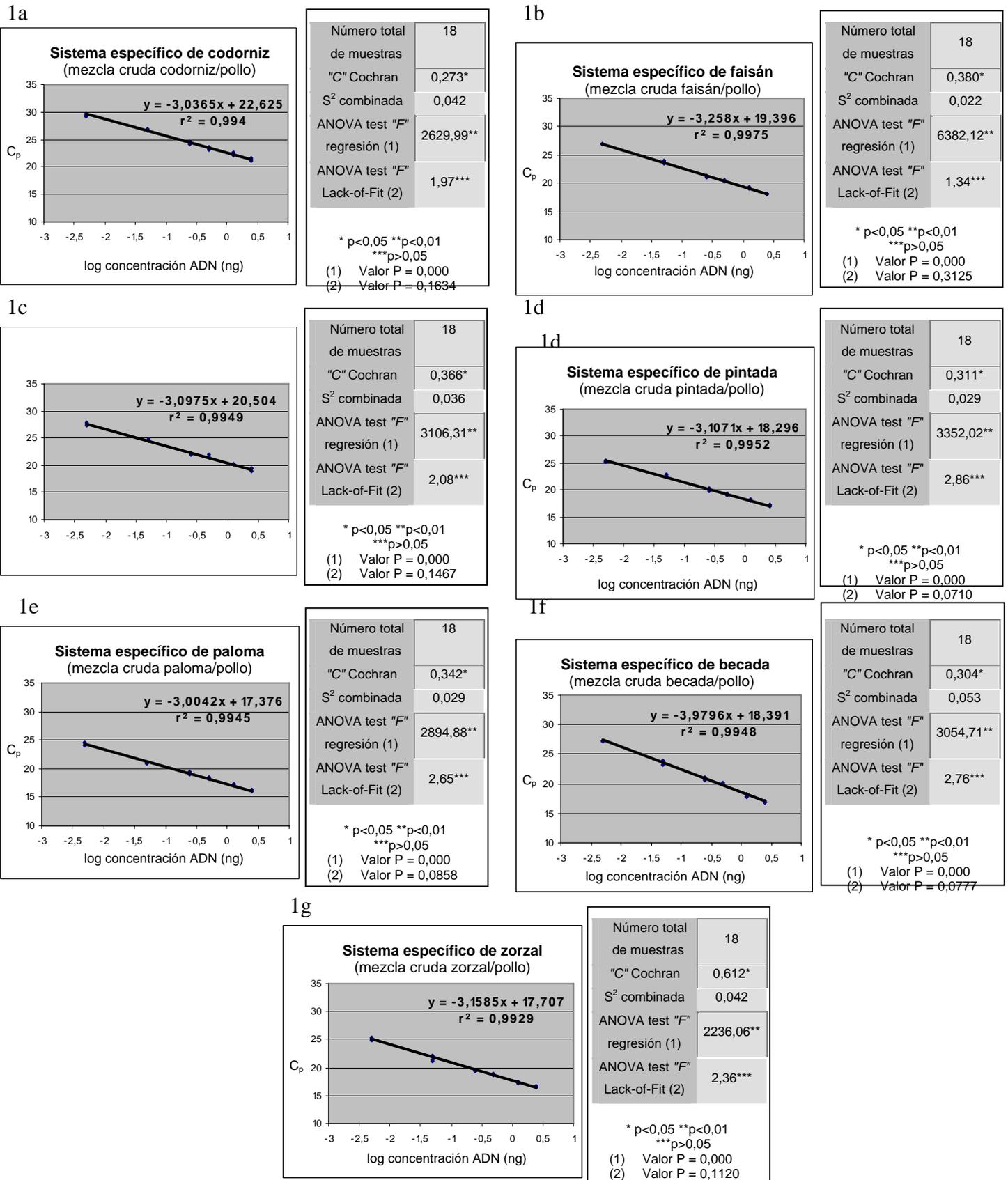
El límite de cuantificación se calculó como la cantidad de ADN estimada para un  $C_p$  de 35 (valor medio menos dos veces la desviación estándar de los valores de  $C_p$  obtenidos en los controles negativos y las especies no diana). En las muestras crudas el límite de cuantificación fue de  $8,4 \times 10^{-5}$ ,  $1,62 \times 10^{-5}$ ,  $2,08 \times 10^{-5}$ ,  $42 \times 10^{-5}$ ,  $1,36 \times 10^{-5}$ ,  $6,7 \times 10^{-5}$ , y  $33,4 \times 10^{-5}$  % de ADN de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal, respectivamente. De igual modo, tras el análisis de las muestras esterilizadas, los límites de cuantificación obtenidos fueron de  $1,3 \times 10^{-3}$ ,  $6,45 \times 10^{-5}$ ,  $4,08 \times 10^{-4}$ ,  $3,68 \times 10^{-5}$ ,  $1,21 \times 10^{-5}$ ,  $5,38 \times 10^{-4}$ , y  $3,2 \times 10^{-5}$  % de ADN de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal, respectivamente.

La linealidad y sensibilidad de la técnica se evaluaron con relación a los porcentajes de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal en las mezclas cárnicas crudas (Figura 1) y esterilizadas (resultados no mostrados). La exactitud del método desarrollado, que indica si la concentración de ADN presente en la muestra influye en la variabilidad de los resultados obtenidos, se verificó mediante el valor obtenido en el test de *t-Student*, ya que el porcentaje de recuperación obtenido en las mezclas crudas y esterilizadas de las siete especies de interés estuvo próximo al 100%.

Los resultados obtenidos indicaron 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 utilización de la técnica de PCR en tiempo real para la cuantificación de especies en un producto cárnico precisaría de la preparación de diferentes rectas de calibrado en función del tratamiento térmico de las muestras y del tipo de tejido analizado.

En este trabajo también se analizaron diversos productos comerciales que contenían carne de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal. La técnica de PCR en tiempo real permitió la detección de la especie diana en todos los productos analizados. En cuanto a la detección cuantitativa, los valores de  $C_p$  obtenidos con los sistemas específico y endógeno en los productos comerciales fueron muy variables, incluso en aquéllos que contenían porcentajes similares de la misma especie (resultados no mostrados). Considerando la gran variedad de ingredientes que se utilizan en la preparación de los productos cárnicos (carne, hígado, grasa, leche, mantequilla, huevos, aceite, caldo, verdura, etc.), así como la diversidad en los tratamientos térmicos aplicados en la industria cárnica, la preparación de diferentes rectas de calibrado para cada tipo de producto resulta inviable. Por tanto, el empleo de la técnica de PCR en tiempo real para el análisis de productos cárnicos queda limitado a una detección cualitativa de

la especie diana, no resultando factible la cuantificación real del contenido de la misma. No obstante, cabe destacar que la capacidad de la técnica para detectar codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal en los productos cárnicos no se vio influenciada por la acción de diversos tratamientos térmicos ni por la presencia de otros ingredientes.



**Figura 1.** Test de linealidad, parámetros de regresión lineal y parámetros de sensibilidad del sistema de PCR en tiempo real desarrollado para la cuantificación de codorniz (1a), faisán (1b), perdiz (1c), pintada (1d), paloma (1e), becada (1f) y zorzal (1g) utilizando mezclas experimentales de cada especie diana (50, 25, 10, 5, 1 y 0,1%) en una matriz de carne de pollo.

La práctica totalidad de los estudios realizados en la identificación genética de especies animales mediante PCR en tiempo real hacen referencia a especies domésticas como la vaca, oveja, cabra, cerdo y pollo (Dooley et al., 2004; Sawyer et al., 2003). Sin embargo, los estudios efectuados para la diferenciación de carnes y productos cárnicos procedentes de aves de caza y de la avicultura alternativa mediante PCR en tiempo real son prácticamente inexistentes, a excepción del trabajo publicado por Chisholm *et al.* (2007) en el que se emplea una técnica de PCR en tiempo real con cebadores y sondas TaqMan especie-específicos diseñados en el gen mitocondrial *citocromo b* para la detección de codorniz y faisán en carnes y productos cárnicos.

### **CONCLUSIÓN:**

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la técnica de PCR en tiempo real permite llevar a cabo la detección específica de carnes y productos cárnicos procedentes de codorniz, faisán, perdiz, pintada, paloma, becada y zorzal de una forma rápida y eficaz, constituyendo una herramienta útil para la detección de prácticas fraudulentas y para garantizar la trazabilidad de los productos que se comercializan.

### **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 2007-60077). María Rojas disfruta de una beca del Ministerio de Educación y Ciencia.

### **BIBLIOGRAFÍA:**

- Camacho, MA, Torres, AI, Gil-Alegre, ME, Obregón, MM, y Ruiz, V.** 1993. Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. *STP Pharma Practiques*, 3:197-202.
- Chisholm, J, Sánchez, A, Brown, J, y Hird, H.** 2008. The development of species-specific real-time PCR assays for the detection of pheasant and quail in food. *Food. Anal. Methods*, 1:190-194.
- Costa, J.** 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 22:299-305.

- Dooley, JJ, Paine, KE, Garrett SD, Brown, HM.** 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Sci.*, 68:431-438.
- Lenstra, JA, Buntjer, JB, y Janssen, FW.** 2001. On the origin of the meat-DNA techniques for species identification in meat products. *Vet. Sci. Tomorrow.*, 2:1-15.
- López-Calleja, I, González, I, Fajardo, V, Martín, I, Hernández, PE, García, T, y Martín, R.** 2007. Real-time TaqMan PCR for quantitative detection of cows' milk in ewes' milk mixtures. *Int. Dairy J.*, 17:729-736.
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).** 2005. Estudio de caracterización de la avicultura de carne alternativa en España.
- Rojas, M, González, I, Fajardo, V, Martín, I, Hernández, PE, García, T, y Martín, R.** 2008. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism authentication of raw meats from game birds. *J. AOAC Int.*, 91:1416-1422.
- Sawyer, J, Wood, C, Shanahan, D, Gout, S, McDowell, D.** 2003. Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*, 14:579-583.
- Wolf, C, Rentsch, J, y Hübner, P.** 1999. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *J. Agric. Food Chem.*, 47:1350-1355.
- Zhang, C, Fowler, MR, Scott, NW, Lawson, G, y Slater, A.** 2007. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*, 18:1149-1158.