

**DETECCIÓN DE ADN BOVINO Y OVINO EN PIENSOS COMERCIALES
MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL
DETECTION OF BOVINE AND OVINE DNA IN COMERCIAL FEEDSTUFFS BY
REAL-TIME PCR**

Nicolette Pegels Rojas, Isabel González Alonso y Rosario Martín de Santos

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 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real utilizando sondas TaqMan, para la detección de la presencia de ADN bovino y ovino en piensos comerciales. El método combina el uso de cebadores específicos de vaca y oveja que amplifican fragmentos de ADN de 84 pb en el gen mitocondrial 12S ARNr y 88 pb en la región mitocondrial D-loop, respectivamente, junto con cebadores universales que amplifican un fragmento conservado de ADN de 141 pb en el gen nuclear 18S ARNr de los organismos eucariotas. La técnica desarrollada permitió detectar hasta un 0,1% de harinas de carne y hueso en las muestras de piensos comerciales analizados.

Palabras clave: PCR en tiempo real, sondas TaqMan, piensos comerciales, 12S ARNr, D-loop, 18S ARNr.

ABSTRACT

A polymerase chain reaction (PCR) assay using TaqMan probes has been developed for detection of bovine and ovine DNA commercial feedstuffs. The real-time PCR method combines the use of bovine and ovine-specific primers that amplify DNA fragments of 84 bp on the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene and 88 bp on the mitochondrial D-loop region, respectively, together with universal primers that amplify a 141 bp DNA fragment on the nuclear 18S ribosomal RNA gene from eukaryotic organisms. The PCR method developed in this assay was able to identify as low as 0.1% bovine and ovine content of meat and bone meals in the feed samples analyzed.

Keywords: Real-time PCR, TaqMan probes, commercial feedstuffs, 12S rRNA, D-loop, 18S rRNA.

INTRODUCCIÓN

La identificación del origen de los distintos componentes que integran los piensos y otros productos alimenticios tiene una gran importancia para garantizar su trazabilidad. En este contexto, la Unión Europea prohibió la utilización de harinas animales en la elaboración de piensos para rumiantes y otros animales de abasto como medida preventiva frente a la

propagación de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) y otras encefalopatías transmisibles. Para garantizar el correcto cumplimiento de la normativa vigente, es necesario disponer de métodos analíticos adecuados que permitan detectar la presencia de tejidos animales en piensos (Prado *et al.*, 2007).

El método oficial para detectar la presencia de harinas de carne y hueso en piensos es el análisis microscópico. Sin embargo, entre las limitaciones inherentes a esta técnica se encuentra el requerir personal cualificado, la imposibilidad de identificar la especie animal presente, así como su lentitud y laboriosidad (Hahn, 1999). Por ello, conviene desarrollar y poner a punto técnicas rápidas que permitan identificar el origen animal de todas las materias primas presentes en un pienso.

El objetivo de este trabajo ha consistido en el desarrollo de una técnica de PCR en tiempo real utilizando sondas fluorescentes TaqMan para detectar la presencia de ADN bovino y ovino en piensos comerciales.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras empleadas y extracción de ADN

En este trabajo se analizaron 62 piensos animales (8 muestras de referencia y el resto de composición desconocida) procedentes del Laboratorio Comunitario de Referencia para proteínas animales en piensos (CRA-W, Bélgica) y de los laboratorios CCL Control (Holanda).

El ADN de las muestras se extrajo utilizando el kit comercial *Wizard® DNA Clean-up system* (Promega, Madison, WI, USA), de acuerdo por el método descrito por Martín *et al.* (2007).

2. Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores utilizados en este trabajo, se emplearon secuencias de los genes 12S ARNr, D-loop y 18S ARNr de varias especies animales, obtenidas de bases de datos y de trabajos previos (Fajardo *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2007).

La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas de los genes mitocondriales 12S ARNr y D-loop, permitió el diseño de dos parejas de cebadores específicos. La primera pareja corresponde a los cebadores específicos de vaca (*12SFWP/12SBTP*) que amplifican un fragmento de 84 pb en el gen mitocondrial bovino 12S ARNr, y la segunda a los cebadores específicos de oveja (*OAMUFTRDIR2/OAMUFTRINV2*), que amplifican un fragmento de 88 pb en la región D-loop de esta especie. Además, se diseñaron sondas TaqMan especie-específicas de vaca (*Bo12S TM*) y oveja (*Ovj TM*), internas a las regiones delimitadas por sus correspondientes parejas de cebadores. Como control positivo de amplificación, se diseñó una pareja de cebadores (*18SFWEU* y *18SRVEU*)

y una sonda TaqMan en el gen 18S ARNr, para la amplificación de un fragmento conservado en el ADN de eucariotas.

3. PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos capilares de vidrio utilizando el equipo LightCycler[®] 2.0 (Roche Applied Science, Painsberg, Germany) con el siguiente programa de amplificación: 10 min a 95 °C, 45 ciclos de 60 s a 95 °C, 30 s a 60 °C (vaca) o 61 °C (oveja) y 60 s a 72 °C. Cada reacción (10 µl) contenía 100 ng de ADN, la mezcla LightCycler[®] TaqMan Master (Roche Applied Science), 2 pmol de sonda TaqMan y los correspondientes cebadores específicos: 300/ 900 nM (vaca y oveja). En idénticas condiciones y en paralelo se llevaron a cabo las reacciones de PCR del control positivo de amplificación, empleando 300/ 900 nM de los cebadores universales y 2 pmol de la sonda 18S TaqMan. El punto de corte o crossing point (Cp) que corresponde a la fracción de número de ciclo en el que la fluorescencia generada por la sonda TaqMan sobrepasa la línea umbral, se calculó automáticamente mediante el software LightCycler[®] como el primer máximo de la segunda derivada de la curva.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De todas las técnicas rápidas, las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) destacan entre las más extendidas para detectar la presencia de material animal en piensos e identificar la especie o especies utilizadas en su elaboración (Dalmaso *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2007). En los últimos años, las técnicas de PCR convencionales han evolucionado hacia procedimientos automatizados en un solo tubo capaces de realizar un seguimiento en tiempo real del proceso de amplificación. En este contexto, recientemente se han desarrollado varias técnicas de PCR en tiempo real para la detección de harinas de carne y hueso en piensos animales (Lahiff *et al.*, 2002; Mendoza-Romero *et al.*, 2004; Bellagamba *et al.*, 2006; Cawthraw *et al.*, 2009). En este trabajo de investigación se ha puesto a punto una técnica de PCR en tiempo real empleando cebadores especie-específicos y sondas TaqMan para detectar la presencia de ADN bovino y ovino en piensos de elaboración industrial.

La elección de marcadores adecuados y el diseño de cebadores que hibriden eficazmente en la secuencia diana, son aspectos críticos para el éxito de cualquier técnica de PCR. Por otra parte, si bien los tratamientos térmicos empleados en la elaboración de los piensos son lo suficientemente intensos como para producir la desnaturalización de los priones, pueden también romper las moléculas de ADN limitando las amplificaciones por PCR de fragmentos relativamente grandes. Por ello, además de la especificidad en su diseño, es fundamental la

utilización de cebadores que delimiten fragmentos de ADN de pequeño tamaño (Rodríguez *et al.*, 2003).

Una vez comprobada la idoneidad de los cebadores diseñados en este trabajo, se evaluó la especificidad de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de las dos especies objeto de estudio. Para ello se analizó el ADN procedente de numerosas especies animales y vegetales (**TABLA 1**). Los sistemas específicos amplificaron los fragmentos de ADN esperados de 84 pb en el gen 12S ARNr de vaca y 88 pb en la región D-loop de oveja, sin producir señal de amplificación a partir del ADN de especies heterólogas. Asimismo, los cebadores universales (control positivo de amplificación) produjeron un fragmento de ADN de 141 pb en el gen 18S ARNr de todas las especies eucariotas analizadas.

TABLA 1. Especificidad de los sistemas de PCR en tiempo real desarrollados para la detección de ADN bovino y ovino en piensos.

Nombre común	Nombre científico	Sist. específico de vaca	Sist. específico de oveja	Control positivo de amplificación
Vaca	<i>Bos taurus</i>	+	-	+
Oveja	<i>Ovis aries</i>	-	+	+
Cabra	<i>Capra hircus</i>	-	-	+
Cerdo	<i>Sus scrofa domestica</i>	-	-	+
Pollo	<i>Gallus gallus</i>	-	-	+
Pavo	<i>Meleagris gallipavo</i>	-	-	+
Pato	<i>Anas platyrhynchos x Cairina muschata</i>	-	-	+
Ganso	<i>Anser anser</i>	-	-	+
Caballo	<i>Equus caballus</i>	-	-	+
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	-	-	+
Gato	<i>Felis catus</i>	-	-	+
Perro	<i>Canis familiaris</i>	-	-	+
Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	-	-	+
Anchoa	<i>Engraulis encrasicolus</i>	-	-	+
Salmón	<i>Salmo salar</i>	-	-	+
Merluza	<i>Merluccius spp</i>	-	-	+
Mero	<i>Epinephelus marginatus</i>	-	-	+
Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>	-	-	+
Atún	<i>Thunnus spp</i>	-	-	+
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	-	-	+
Maíz	<i>Zea mays</i>	-	-	+
Avena	<i>Avena sativa</i>	-	-	+
Soja	<i>Glycine max</i>	-	-	+
Centeno	<i>Secale cereale</i>	-	-	+
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	-	-	+

La aplicabilidad de la técnica de PCR en tiempo real se determinó mediante el análisis de una batería de 62 piensos comerciales (8 muestras de referencia y el resto de composición desconocida) elaborados por dos laboratorios europeos (**TABLA 2**). Concluidos los análisis, los resultados obtenidos en la detección de vaca y oveja se contrastaron con los datos de composición real de los piensos, proporcionados posteriormente por los laboratorios de

TABLA 2. Resultados del análisis de las muestras de piensos comerciales (de referencia y de composición desconocida) con los sistemas de PCR en tiempo real específicos de vaca y oveja

Pienso		PCR en tiempo real		
Muestras de referencia	Procedencia	Sist. específico de vaca	Sist. específico de oveja	Control positivo de amplificación
0.1% vaca	CRA-W ^a	+	-	+
1% vaca	CRA-W	+	-	+
0.1% vaca	CCL Control ^b	+	-	+
1% vaca	CCL Control	+	-	+
100% vaca	CCL Control	+	-	+
0.1% oveja	CCL Control	-	+	+
1% oveja	CCL Control	-	+	+
100% oveja	CCL Control	-	+	+
Muestras problema				
P ₁	CRA-W	-	-	+
P ₂	CRA-W	+	-	+
P ₃	CRA-W	-	-	+
P ₄	CRA-W	-	-	+
P ₅	CRA-W	+	-	+
P ₆	CRA-W	-	-	+
P ₇	CRA-W	+	-	+
P ₈	CRA-W	-	-	+
P ₉	CRA-W	+	-	+
P ₁₀	CRA-W	+	-	+
P ₁₁	CRA-W	-	-	+
P ₁₂	CRA-W	+	-	+
P ₁₃	CRA-W	+	-	+
P ₁₄	CRA-W	-	-	+
P ₁₅	CCL Control	-	-	+
P ₁₆	CCL Control	-	-	+
P ₁₇	CCL Control	+	-	+
P ₁₈	CCL Control	+	-	+
P ₁₉	CCL Control	+	-	+
P ₂₀	CCL Control	+	-	+
P ₂₁	CCL Control	+	-	+
P ₂₂	CCL Control	+	-	+
P ₂₃	CCL Control	-	-	+
P ₂₄	CCL Control	-	-	+
P ₂₅	CCL Control	-	-	+
P ₂₆	CCL Control	-	-	+
P ₂₇	CCL Control	-	-	+
P ₂₈	CCL Control	-	-	+
P ₂₉	CCL Control	-	-	+

TABLA 2 (continuación)

Pienso		PCR en tiempo real		
Muestras problema	Procedencia	Sist. específico de vaca	Sist. específico de oveja	Control positivo de amplificación
P ₃₀	CCL Control	-	+	+
P ₃₁	CCL Control	181	+	+
P ₃₂	CCL Control	-	+	+
P ₃₃	CCL Control	-	+	+
P ₃₄	CCL Control	-	+	+

origen. La detección de la presencia de vaca y oveja concordó en un 100% con el contenido real de estas especies en las muestras de pienso analizadas. Estos resultados sugieren que la técnica de PCR en tiempo real desarrollada es sensible y específica, permitiendo la detección de hasta un 0,1% de harinas de carne y hueso de vaca y oveja en piensos animales

CONCLUSIÓN

La metodología de PCR en tiempo real propuesta, que emplea cebadores específicos de especie (vaca y oveja) y cebadores universales de organismos eucariotas, constituye una herramienta rápida, sensible y fiable que tiene gran interés para el control de la presencia de harinas de carne y hueso en piensos. Su utilización puede contribuir a garantizar el cumplimiento de las normas de la Unión Europea, facilitar la trazabilidad de los productos comercializados y evitar prácticas fraudulentas en la elaboración de piensos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia de España (proyecto AGL 2007-60077) y por la Comunidad de Madrid (Programa de Vigilancia Sanitaria S-0505/AGR/000265). Nicolette Pegels disfruta de un contrato de la Comunidad de Madrid.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarts, HJM, Bouw, EM, Buntjer, JB, Lenstra, JA y van Raamsdonk, LWD.** 2006. Detection of bovine meat and bone meals in animal feed at a level of 0.1%. *J. AOAC Int.* 89: 1443-1446.
- Bellagamba, F, Comincini, S, Ferretti, L, Valfré, F y Moretti, VM.** 2006. Application of Quantitative real-time PCR in the detection of prion-protein gene species-specific DNA sequences in animal meals and feedstuffs. *J. Food Prot.* 69:891-896.
- Cawthraw, S, Saunders, G.C, Martin, T.C, Sawyer, J, Windl, O. y Reaney, S.D.** 2009. Real-time PCR detection and identification of prohibited mammalian and avian material in animal feeds. *J. Food Prot.* 72: 1055-1062.
- Dalmaso, A, Fontanella, E, Piatti, P, Civera, T, Rosati, S. y Bottero, M.T.** 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol. Cell. Probes.* 18: 81-87.
- Fajardo, V, González, I, López-Calleja, I, Martín, I, Hernández, P.E, García, T. y Martín R.** 2006. PCR-RFLP 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*). *Journal. Agric. Food Chem.* 54: 1144-1150.

- Hahn, H.** 1999. Animal meal: production and determination in feedstuffs and the origin of bovine spongiform encephalopathy. *Naturwissenschaften*. 86: 62-70.
- Krcmar, P, y Rencova, E.** 2005. Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meal. *J. Food Prot.* 68: 1217-1221.
- Lahiff, S, Glennon, M, Lyng, J, Smith, T, Shilton, N. y Maher, M.** 2002. Real-time polymerase chain reaction detection of bovine DNA in meat and bone meal samples. *J. Food Prot.* 65: 1158-1165.
- Martín, I, García, T, Fajardo, V, López-Calleja, I, Hernández, PE, González, I y Martín, R.** 2007. Species-specific PCR for the identification of ruminant species in feedstuffs. *Meat Sci.* 75: 120-127.
- Mendoza-Romero, L, Verkaar, E.L.C, Savelkoul, P.J.M, Catsburg, A, Aarts, H.J.M, Buntjer, J.B. y Lenstra, J.A.** 2004. Real-time PCR detection of ruminant DNA. *J. Food Prot.* 67: 550-554.
- Prado, M, Berben, G, Fumière, O, van Dujin, G, Mensinga-Kruize, J, Reaney, S, Boix, A y von Holst, C.** 2007. 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.* 55:7495-7501.
- Rodríguez, M.A, García, T, González, I, Asensio, L, Mayoral, B, Lopez-Calleja, I, Hernández, P.E. y Martín, R.** 2003. Identification of goose, mule duck, chicken, turkey, and swine in *foie gras* by species-specific polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1524-1529.