

DETECCIÓN DE ADN DE PESCADO EN PIENSOS VEGETALES MEDIANTE UNA TÉCNICA DE PCR EN TIEMPO REAL

DETECTION OF FISH DNA IN FEEDSTUFFS BY REAL-TIME PCR

I. Martín de la Torre, T. García Lacarra y R. Martín de Santos

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de
Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid

Resumen

Se ha desarrollado una técnica de PCR en tiempo real, utilizando el agente intercalador fluorescente SYBR® Green, para la detección cuantitativa de la presencia de harinas de pescado en piensos. El método combina el uso de cebadores específicos de pescado que amplifican un fragmento de 87 pb del gen mitocondrial ARNr 12S, junto a cebadores universales que amplifican un fragmento conservado de 99 pb del gen nuclear ARNr 18S en el ADN de los organismos eucariotas. La técnica desarrollada permitió detectar y cuantificar hasta un 0,1% de ADN de pescado en mezclas experimentales de pescado/avena.

Abstract

A quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay using SYBR green detection system has been developed for detection of fishmeal in feedstuffs. The real-time PCR method combines the use of fish-specific primers that amplify a 87 bp fragment of the mitochondrial 12S ribosomal RNA gene from fish species, and universal primers that amplify a 99 bp fragment of the nuclear 18S ribosomal RNA gene from eukaryotic DNA. The PCR method developed was applied to fish tissues/oats binary mixtures demonstrating its suitability for the detection of fish DNA in mixtures containing as low as 0.1% of fish tissues.

Palabras clave: harinas de pescado, PCR en tiempo real, SYBRGreen, piensos, 12S y 18S ARNr.

Keywords: Fishmeal, feedstuffs, Real-time PCR, SYBR green, 12S and 18S rRNA.

Introducción

Las harinas de pescado se han empleado frecuentemente en la elaboración de piensos animales como fuente de nutrientes. Sin embargo, la Unión Europea prohibió la utilización de harinas animales, incluidas las de pescado, en la elaboración de piensos para rumiantes como

medida preventiva para evitar la propagación de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) (Comisión de las Comunidades Europeas, 2000, 2001). Para garantizar el cumplimiento de esta normativa, es necesario disponer de técnicas analíticas que permitan la detección y diferenciación de tejidos animales (pescados, mamíferos y aves) en piensos. 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.

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 y cuantificación de ADN de pescado en piensos de origen vegetal. La técnica está basada en la amplificación de fragmentos específicos del gen ARN ribosómico 12S.

Material y métodos

1. Preparación de las muestras y extracción de ADN

Las muestras de pescado y las materias primas vegetales se adquirieron en comercios minoristas de Madrid. Las muestras de tejido muscular de mamíferos y aves se obtuvieron de mataderos ubicados en la Comunidad de Madrid o del Hospital Clínico Veterinario (Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid).

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

2. Diseño de cebadores

La alineación y análisis informático de las secuencias nucleotídicas del gen mitocondrial ARNr 12S obtenidas a partir del fragmento de 208 pb amplificado por los cebadores 12SA y 12SB (Asensio *et al.*, 2001), permitió el diseño de la pareja de cebadores *12SpFISHDIR* y *12SpFISHINV* para la amplificación específica de un fragmento de 87 pb del gen mitocondrial ARNr 12S a partir de ADN de todos los pescados. Además, se diseñó la pareja de cebadores *18SFWEU* y *18SRVEU* en el gen nuclear ARNr 18S para la amplificación de un fragmento de 99 pb en el ADN de cualquier organismo eucariota. Estos cebadores se utilizaron como control endógeno con el fin de normalizar los valores obtenidos con los cebadores específicos.

3. PCR en tiempo real

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 10 µl, con el siguiente programa de amplificación: 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 5 s a 63 °C y 4 s a 72 °C. Se emplearon 10 ng de ADN y 300 nM de los cebadores específicos (*12SpFISHDIR-12SpFISHINV*) o universales (*18SFWEU-18SRVEU*). Para la detección de los fragmentos se empleó el agente intercalador fluorescente SYBR® Green (Applied Biosystems).

4. Análisis de datos

Los sistemas de PCR en tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción y no por medir la cantidad de producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos. Así, la técnica de PCR en tiempo real proporciona datos de fluorescencia en cada ciclo de amplificación. La amplificación producida en cada ciclo de la PCR se traduce en un incremento en la cantidad de ADN de doble cadena que se une al SYBR® Green, provocando un aumento de la fluorescencia. El C_p es la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia generada por el SYBR Green sobrepasa la línea umbral y se corresponde con el primer máximo de la segunda derivada de la curva.

La cuantificación del ADN de pescado en las muestras problema se llevó a cabo interpolando el C_p normalizado obtenido en las mismas, en una recta estándar realizada a partir de los valores de C_p obtenidos de mezclas binarias experimentales. Las mezclas experimentales se prepararon tanto crudas como sometidas a un tratamiento térmico de esterilización (121 °C/20 min) y contenían un 25, 10, 5, 1 y un 0,1% de tejido muscular de pescado en una matriz vegetal de avena.

Los valores de C_p obtenidos en cada muestra (a partir de 10 ng de ADN) con el sistema específico de pescado (C_{pPEsS}), se normalizaron de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$C_{pPEs} = C_{pEU} * C_{pPEsS} / C_{pEUS}$$

donde: C_{pEU} es el valor de C_p obtenido para la mezcla del 0,1% en el sistema endógeno; C_{pPEsS} es el valor de C_p de la muestra problema en el sistema específico de pescado; C_{pEUS} es el valor de C_p obtenido para la muestra en el sistema endógeno y C_{pPEs} es el valor de C_p que se corresponde con el porcentaje de ADN de pescado en la muestra problema.

Los valores de C_p normalizados se analizaron estadísticamente con el fin de evaluar la linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud del ensayo.

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 (Tabla 1). El sistema específico amplificó un fragmento de 87 pb a partir del ADN de todas las especies de pescado analizadas (C_p entre 17,13 y 22,24) pero no produjo amplificación a partir del ADN de otras especies (C_p entre 31,09 y 37,78) confirmando la especificidad del método. Los cebadores universales de eucariotas (control endógeno) amplificaron un fragmento de 99 pb en el ADN de todas las especies analizadas (C_p entre 13,89 y 20,52).

El límite de cuantificación se calculó como la cantidad de ADN de pescado correspondiente a un C_p de 30,35 (media menos dos veces la desviación estándar de los controles negativos y las especies no diana). En las muestras crudas, el límite de cuantificación fue de 2 pg, lo que corresponde a 0,02% de ADN de pescado (Figura 1A), mientras que en las mezclas tratadas térmicamente fue de 24 pg (0,2%) (Figura 1B).

La linealidad y sensibilidad de la técnica se evaluaron en mezclas crudas (Figura 1A) y esterilizadas (Figura 1B).

Discusión

Recientemente se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real para la detección cuantitativa de harinas de carne y hueso (MBMs) en piensos animales (Aarts *et al.*, 2006; Krcmar and Rencova 2005; Mendoza-Romero *et al.*, 2004; Rensen *et al.*, 2005).

La técnica de PCR en tiempo real desarrollada en este trabajo permitió detectar y cuantificar la incorporación de pequeñas cantidades de ADN de pescado (0,2-25%) en mezclas experimentales incluso en aquellas sometidas a tratamientos térmicos muy intensos que pueden degradar su ADN. No obstante, los resultados obtenidos indican que el tipo de tratamiento térmico de la muestra influye en las ecuaciones de cuantificación del porcentaje de pescado. En consecuencia, la cuantificación requiere la preparación de rectas de calibrado con un tratamiento térmico similar al de las muestras problema.

Conclusión

La metodología de PCR en tiempo real propuesta, que emplea cebadores específicos de pescado 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 de pescado en alimentos procesados y 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). Irene Martín disfruta de una beca de la Universidad Complutense de Madrid.

Bibliografía

Aarts, HJM., Bouw, EM. Buntjer, JB. Lenstra, JA. y van Raamsdonk, LWD. 2006. Detection of bovine meat and bone meal in animal feed at a level of 0.1%. *J. AOAC Int.* 89:1443-1446.

Asensio, L., González, I. Fernández, A. Rodríguez, MA. Hernández, PE. García, T. Martín, R. 2001. PCR-SSCP: A simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish (*Polyprion americanus*), and Nile perch (*Lates niloticus*) fillets. *J. Agric. Food Chem.* 49:1720-1723.

COMISION DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2000. Decisión del Consejo 2000/766/CE de 4 de diciembre de 2000 relativa a determinadas medidas de protección contra las encefalopatías espongiiformes transmisibles y la utilización de proteínas animales en la alimentación. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 306:32-33.

COMISION DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2001. Decisión de la Comisión 2001/9/CE de 29 de diciembre de 2000 relativa a las medidas de control requeridas para la aplicación de la Decisión 2000/766/CE del Consejo relativa a determinadas medidas de protección contra las encefalopatías espongiiformes transmisibles y la utilización de proteínas animales en la alimentación animal. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 2:32-40.

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 meals. *J. Food Prot.* 68:1217-1221.

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.

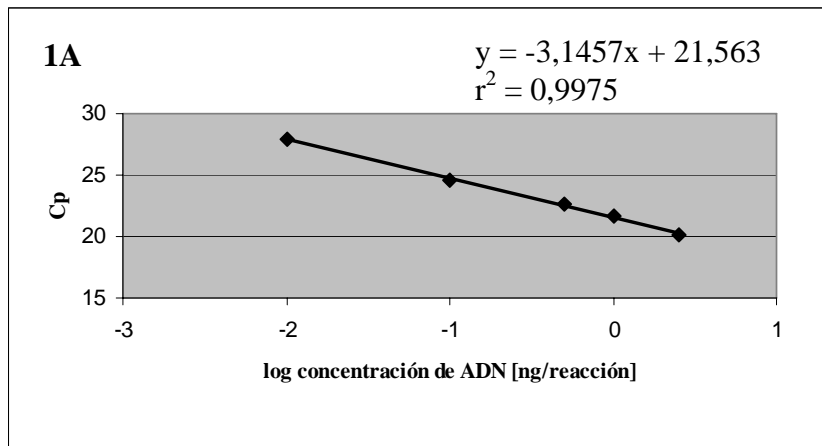
Mendoza-Romero, L., Verkaar, ELC. Savelkoul, PH. Catsburg, A. Aarts, HJM. Buntjer, JB. y Lenstra, JA. 2004. Real-time PCR detection of ruminant DNA. *J. Food Prot.* 67:550-554.

Rensen, G., Smith, W. Ruzante, J. Sawyer, M. Osburn, B. y Cullor, J. 2005. Development and evaluation of a real-time fluorescent polymerase chain reaction assay for the detection of bovine contaminants in cattle feed. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2:152-159.

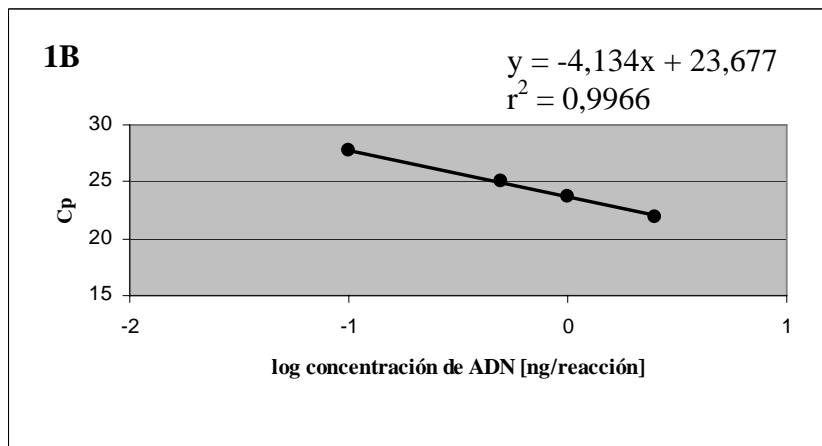
TABLA 1. Especificidad del método de PCR en tiempo real desarrollado, expresado por los valores de Cp obtenidos a partir de 10 ng ADN con los cebadores específicos de pescado. Los valores de Cp obtenidos en el sistema endógeno constituyen un control positivo de amplificación a partir del ADN de cualquier organismo eucariota

Nombre común	Nombre científico	SISTEMA ESPECÍFICO	SISTEMA ENDÓGENO
Arenque	<i>Clupea harengus</i>	21.01±0.15	15.77±0.14
Atún blanco	<i>Thunnus alalunga</i>	19.11±0.27	15.26±0.81
Atún rojo	<i>Thunnus thynnus</i>	17.86±0.29	16.04±1.02
Bacalao	<i>Gadus morhua</i>	19.76±0.16	16.01±0.55
Besugo	<i>Pagellus bogaraveo</i>	20.83±0.54	17.86±0.47
Bonito	<i>Sarda sarda</i>	18.02±0.53	17.64±0.94
Boquerón	<i>Engraulis encrasicolus</i>	20.09±0.31	19.05±0.18
Caballa	<i>Scomber scombrus</i>	21.05±0.14	16.31±0.60
Cazón	<i>Galeorhinus galeus</i>	19.50±0.35	18.24±1.07
Dorada	<i>Sparus aurata</i>	18.24±0.15	19.01±1.05
Eglefino	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	17.72±0.81	16.24±0.87
Faneca	<i>Trisopterus luscus</i>	22.24±0.91	18.27±0.89
Gallo	<i>Lepidorhombus boscii</i>	19.87±0.31	17.86±0.75
Gallo del norte	<i>Lepidorhombus whiffiagonis</i>	18.45±0.91	18.09±0.65
Halibut	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	19.55±0.32	15.56±0.26
Jurel	<i>Trachurus trachurus</i>	18.42±0.97	18.76±0.47
Lenguado	<i>Solea solea</i>	21.44±0.66	17.51±0.46
Lisa	<i>Liza aurata</i>	19.61±0.23	15.55±0.38
Melva	<i>Auxis rochei</i>	20.38±0.75	17.58±0.08
Merluza	<i>Merluccius merluccius</i>	18.19±0.53	17.01±0.50
Palometa	<i>Brama brama</i>	18.58±0.43	15.47±0.58
Panga	<i>Pangasius hypophthalmus</i>	17.13±0.15	17.45±0.76
Perca	<i>Lates niloticus</i>	20.06±0.12	19.53±0.65
Pez espada	<i>Xiphias gladius</i>	18.99±0.15	16.78±0.79
Platija	<i>Dicologlossa cuneata</i>	20.42±0.46	17.70±0.02
Rape	<i>Lophius spp</i>	19.62±0.43	14.73±0.67
Salmón	<i>Salmo salar</i>	18.89±0.82	14.84±0.65
Sardina	<i>Sardina pilchardus</i>	17.13±0.79	17.17±0.27
Solla	<i>Pleuronectes platessa</i>	21.46±0.50	15.88±0.74
Trucha arcoiris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	18.31±0.55	13.89±0.02
<hr/>			
Vaca	<i>Bos taurus</i>	31.09±0.21	19.70±0.21
Oveja	<i>Ovis aries</i>	37.42±0.72	19.03±0.19
Cabra	<i>Capra hircus</i>	36.55±0.11	17.32±0.11
Cerdo	<i>Sus scrofa domestica</i>	37.12±0.21	20.52±0.47
Pollo	<i>Gallus gallus</i>	34.82±0.70	16.51±0.38
Pavo	<i>Meleagris gallipavo</i>	31.42±0.75	15.56±1.12
Pato	<i>Anas platyrhynchos x Cairina muschata</i>	35.28±0.70	16.76±0.59
Oca	<i>Anser anser</i>	34.98±0.70	15.23±0.56
Caballo	<i>Equus caballus</i>	33.76±0.05	19.54±0.43
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	33.71±0.17	19.55±0.75
Gato	<i>Felis catus</i>	31.87±0.62	20.32±0.85
Perro	<i>Canis familiaris</i>	34.75±0.81	19.19±1.50
Rata	<i>Rattus norvegicus</i>	37.78±0.65	19.23±0.41
Centeno	<i>Hordeum vulgare</i>	33.94±0.11	15.58±0.77
Maíz	<i>Zea mays</i>	34.03±0.09	14.26±0.62
Avena	<i>Avena sativa</i>	32.49±0.78	20.15±0.81
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	31.86±0.27	14.66±0.07
Cebada	<i>Secale cereale</i>	36.09±0.79	16.07±0.32
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	35.11±0.08	16.11±0.57

FIGURA 1. Análisis de la linealidad (análisis de la varianza: ANOVA, test de Cochran) y sensibilidad (sensibilidad de calibrado, sensibilidad analítica, capacidad discriminante) del método de cuantificación de ADN de pescado en mezclas experimentales pescado/avena que contienen un 25, 10, 5, 1 y 0,1% de tejido muscular crudo. 1A) y tejido muscular tratado térmicamente (121 °C 20 min). 1B). * p<0,05; **p<0,01.



Número total de muestras	15
"C" Cochran	0,4294*
S ² comb	0,0262
Test ANOVA "F" regresión	2629,62** Valor p= 0,000
Test ANOVA "F" Lack-of-Fit	3,27** Valor p= 0,067
Capacidad discriminante	0,14*



Número total de muestras	12
"C" Cochran	0,4773*
S ² comb	0,0214
Test ANOVA "F" regresión	1525,12** Valor p= 0,000
Test ANOVA "F" Lack-of-Fit	4,4** Valor p= 0,051
Capacidad discriminante	0,11*