

USO DE TECNOLOGÍAS DE ADN PARA LA DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS DE CONSUMO HUMANO.

TRAZABILIDAD GENÉTICA

Raquel González-Ayala¹, Sonia González-Ayala¹, María Hernández-Montero², Candela López-Viso², Laura Soto-Molina², Lucía Millán-Casado¹, Nerea Recio-Cortés², Antonieta Rodríguez-Ríos¹, Elena León-Rodríguez¹, Marcos Mateo-Fernández², Araceli Espino-García⁴, Gabriel Anaya Calvo-Rubio⁴, Mónica Calderón-Santiago³, Manuel Mora-Márquez³, José Joaquín Ramos-Miras³, Pilar Gema Rodríguez-Ortega³, Alberto Membrillo-del Pozo³

1 IES FIDIANA (CÓRDOBA)

2 CES LOPE DE VEGA (CÓRDOBA)

3 Departamento de Didáctica de las Ciencias Sociales y Experimentales, Facultad de Ciencias de la Educación, Universidad de Córdoba.

4. GRUPO MERADEM, Departamento de Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.



INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Dr. Alberto Membrillo del Pozo (Departamento de Didácticas de las Ciencias Sociales y Experimentales, Facultad de Ciencias de la Educación, UCO)

PROFESORES COORDINADORES:

Dra. Elena León Rodríguez (IES Fidiana de Córdoba)
Dr. Marcos Mateo Fernández (CES Lope De Vega de Córdoba)



INTRODUCCIÓN

La identificación de las materias primas que componen los productos alimenticios que se venden hoy en día en el mercado tiene una gran importancia para garantizar la seguridad y calidad en el proceso de elaboración y preparación de éste en cada una de sus etapas, es decir, su **trazabilidad**. A pesar de los esfuerzos por mejorar los mecanismos de control de la cadena alimentaria, son ya varios los casos de identificación de componentes no permitidos o de mal etiquetado en los alimentos destinados al consumo humano, como por ejemplo la identificación de carne de caballo en productos cárnicos o la utilización de harinas animales en la elaboración de piensos para rumiantes, que dio lugar a la Encefalopatía Espongiforme Bovina, conocida como la Crisis de las vacas locas (MEMBRILLO *et al.* 2013). La normativa actual obliga a utilizar sistemas de identificación para controlar la trazabilidad, como por ejemplo crotales, microchips o códigos de barra. Sin embargo, estos sistemas fallan ya que en la manipulación del animal puede perderse algún sistema de identificación pudiendo darse prácticas fraudulentas en el mercado. Por ello, es necesario que existan técnicas basadas en el uso de nuevas tecnologías de genética y biología molecular que permitan una correcta identificación (Martín *et al.* 2008; Rojas *et al.* 2009).

El **objetivo** principal de este proyecto ha sido determinar la especie de procedencia de una muestra de carne problema mediante una técnica de análisis muy utilizada en biología molecular, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La carne procede de una hamburguesa vendida como ternera en un restaurante real. Sin embargo, un cliente nos ha proporcionado una muestra advirtiendo de un posible fraude en el origen de procedencia de la carne.

OBJETIVOS

- Garantizar la ausencia de fraudes en el etiquetado de los alimentos que consumimos.
- Evitar posibles enfermedades que una estafa pueda causar.
- Concienciamos de la cantidad de fraudes que hay hoy en día.
- Conocer la técnica PCR y sus aplicaciones en Biología Molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1º Preparación de muestras de humano, cerdo, ternera, sardina, cordero y hamburguesa problema



2º Extracción de ADN de tejido animal con kit comercial

3º PCR y procesado de muestras

REACTIVOS	VOLUMEN (µl)
Tempo PCR (50)	2,5
MgCl ₂ (50mM)	1
NT200 (10x)	1,2
Primer mix	4
Tempo polimerasa	0,1
Agua dest.	18,2
ADN	2,5

ENZIMA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	0,5	
Anilamiento	60	1	35
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	1
Metastancado	12	hold	

Tabla 1. Cantidad añadida por reactivo utilizado en la mix para PCR

Tabla 2: condiciones para la amplificación del ADN en termociclador

4º Diseño de un sistema de identificación para averiguar el origen del problema

Cebadores	Especie	Gen	Oligonucleótidos	Amplificación (pb)
Ruminante	Bos taurus ^a	ADN 108	5' GAA AGG ACA AGA GAA ATA AGG 3' / 108 3' TAG GCG CTT CTC TAG GCG A 3'	104
Pollino	Das. conylo domesticus ^b	ADN 124	5' CTA CAT AAG AAT ATC CAC CAG A 290 3' ACA TTG TGG GAT CTT CTA GGT 3'	290
Porcino	Sardines melanocephalus ^c	ADN 128	5' TAA GAG GCG GGG TAA AAC TC 3' 234 3' GTG GGG TAT CTA ATC CCA G 3'	234
Avia de carne	Meleagris gallopavo ^d	ADN 124	5' TGA GAA CTA CGA GCA CAA AC 3' 183 3' GGG CTA TTG AAG TCA CTG TT 3'	183

^a Bovinos

^b Ovinos

^c Caprinos

^d Gallinas

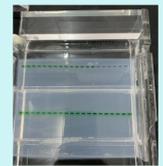
Tabla 4. Diseño experimental del sistema específico para la determinación de la trazabilidad de la muestra problema.

Sistema específico ^a	Muestra ADN						Control (H ₂ O)
	Humano	Cerdo	Ternero	Pollo	Sardina	Cordero	
Ruminante	1(-)	2(-)	3(+)	4(-)	5(-)	6(+)	7(-)
Cerdo	8(-)	9(+)	10(-)	11(-)	12(-)	13(-)	14(-)
Pollo	15(-)	16(-)	17(-)	18(+)	19(-)	20(-)	21(-)
Sardina	22(-)	23(-)	24(-)	25(-)	26(+)	27(-)	28(-)

^a La columna hace referencia a los cebadores utilizados para buscar la amplificación de esa especie en concreto.
^b El número indica el carril en el que se carga la muestra en el gel de electroforesis. El signo (+) indica que se espera que amplifique esa combinación entre cebador y muestra de ADN, (-) indica que si se espera que amplifique.

1. Se emplearon los cebadores específicos para regiones de ADN mitocondrial. (Tabla 3)
2. Se realizó un análisis de los resultados esperados según la pareja de cebadores empleada y la muestra de ADN utilizada, para saber que PCRs tenían que ser positivas para la determinación de la especie de la muestra problema control
3. Observamos la amplificación de cada muestra control con cada pareja de cebadores para confirmar que las parejas de cebadores amplificaban la especie para la que estaban diseñados y de esta forma, confirmaríamos la especificidad de los cebadores para cada especie
4. El ADN de la muestra problema se amplificaría con todos los cebadores específicos de cada especie, de forma que el cebador o cebadores concretos que amplificaran la muestra problema, determinarían la especie de la muestra problema. (Tabla 4)

5º Electroforesis en gel de agarosa al 2 % y toma de datos



RESULTADOS

GEL DE CALIDAD DEL ADN

Comprobación del ADN extraído en gel de agarosa al 1,5% mediante electroforesis (Figura 1) para comprobar la presencia o ausencia de ADN, ver la integridad del mismo y cuantificarlo.

Se observó cierta degradación del material genético en las muestras de sardina y cerdo. En las muestras de ADN de salvia se observan bandas que presumiblemente son de ARN arrastrado en el proceso de extracción



Figura 1: Gel de calidad (M) marcador; (1) sardina, (2) ternera; (3) pollo, (4) muestra problema, (5) salvia, (6) cerdo, (7) muestra problema, (8) salvia

ELECTROFORESIS DE ADN

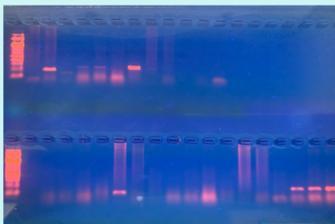


Figura 2: Gel de electroforesis muestras de ADN amplificadas por PCR

La intensidad de fluorescencia de cada banda, este determinará si la muestra da positivo o negativo. Si existe fluorescencia de una muestra, es positiva, ha habido amplificación. Si no se observa fluorescencia, significa que es negativa, no ha habido amplificación.

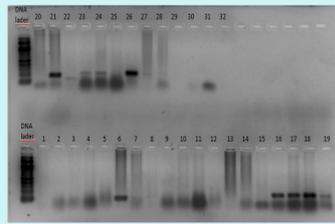


Figura 3: Foto de muestras de ADN amplificadas por PCR

En la Figura 3 se observa el gel obtenido donde las bandas negro intenso muestran los resultados positivos.

Tabla 5. Resultado del análisis de la muestra problema y de referencia conocida con los sistemas de PCR específicos de ruminante, cerdo, pollo y sardina.

Sistema específico ^a	Muestra ADN						Control (H ₂ O)
	Humano	Cerdo	Ternero	Pollo	Sardina	Cordero	
Ruminante	-	-	-	-	-	+	-
Cerdo	-	-	-	-	-	-	-
Pollo	-	+	+	+	+	-	-
Sardina	-	+	+	+	+	-	-

(+) Presencia de ADN amplificado, (-) ausencia de ADN amplificado.
(fondo verde) coincide con lo esperado, (fondo rojo) no coincide con lo esperado

La tabla 5 muestra los datos extraídos a partir del gel (Figura 3).

- El ADN de cerdo amplifica con el sistema de referencia específica para pollo (cebadores específicos de ADN de pollo).
- El ADN de la muestra problema amplifica también con los cebadores del sistema específico de pollo.
- El ADN de ternera no amplifica con el sistema de referencia para ruminantes pero sí cuando usamos los sistemas de referencia para pollo y sardina.
- La muestra de ADN de sardina también consigue amplificar cuando se utiliza el sistema de referencia para pollo.
- El resto de resultados obtenidos sí coinciden con los esperados (Tabla 4).

La única posibilidad de determinación de la especie de la muestra problema es que sea de pollo, afirmando que efectivamente la especie de procedencia de la hamburguesa no es de ternera, sino de pollo, mostrando así una actitud fraudulenta por parte del restaurante. Sin embargo, al resultar positivas las muestras de ternera y sardina con los cebadores de pollo, cabe la posibilidad de que el positivo obtenido de la muestra problema sea debida a una contaminación cruzada de ADN de pollo en el resto de sistemas en los que ha amplificado.

CONCLUSIÓN FINAL

La trazabilidad es un conjunto de medidas y procedimientos, que nos muestra información sobre el producto que vamos a consumir. Gracias a la trazabilidad, mediante un sistema de identificación adecuado, se puede conocer el origen, trayectoria, ubicación y movimientos de un producto a lo largo de la cadena, desde su origen, hasta su consumo final. Es muy importante tanto para la salud como para evitar posibles fraudes.

AGRADECIMIENTOS

- A los investigadores e investigador principal Alberto Membrillo
- A los coordinadores IES Elena León y Marcos Mateo
- Al IES Fidiana y al CES Lope de Vega
- Al proyecto SCIENCE IES
- Al Departamento de Didáctica de Ciencias experimentales y al Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

CONCLUSIONES

1. Debemos ser muy minuciosos con el material de trabajo y las muestras ya que pueden conllevar a errores experimentales.
2. La muestra problema dio positivo para los marcadores moleculares específicos de pollo (por tanto encontramos ante un posible fraude alimentario).
3. El sistema de identificación diseñado no se ha validado totalmente probablemente a os problemas de contaminación