

SEGURIDAD ALIMENTARIA Y FRAUDES: IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN ALIMENTOS MEDIANTE RAPD-PCR.

Calvo, J.H., Osta, R., Zaragoza, P.

Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria.
C/ Miguel Servet 177. 50013-Zaragoza

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la industria alimentaria y todos los campos relacionados con la misma están incrementando su importancia. A esta situación hay que añadir la exigencia, por parte de los consumidores, de una mejor presentación y etiquetado de los productos elaborados y frescos (conservas, ahumados, productos semielaborados...) además de una máxima seguridad higiénica. Esta máxima seguridad conlleva una calidad más alta de los productos que se demandan por parte del mercado. Para finalizar los consumidores exigen, cada vez más, la autenticidad de los alimentos que van a consumir, de forma que el origen y el etiquetado de estos productos correspondan con la composición del producto (quesos, patés, salchichas, embutidos, hamburguesas...). Ante estas situaciones se han desarrollado una serie de técnicas para identificar las especies animales, con el objetivo de evitar fraudes de sustitución de una especie de mayor valor económico por otra de menor valor económico, y la detección de especies que pueden presentar problemas sanitarios como es en la actualidad los productos bovinos debido a la encefalopatía espongiforme bovina (BSE). La utilización de algunas técnicas actuales presentan el problema de ser lentas y caras, y además no se pueden aplicar a productos que hayan sido sometidos a tratamiento térmico u otros tipos de procesados, como son los curados. Para evitar estos problemas en la actualidad se están poniendo a punto técnicas basadas en el análisis de ADN, con la finalidad de desarrollar métodos más sensibles y aplicables a todos los productos. Por las razones anteriormente expuestas, se intenta conseguir con este trabajo el desarrollo de una metodología más sencilla, eficaz y económica que nos permita resolver los problemas antes expuestos. La técnica RAPD-PCR se presenta como candidata para la discriminación de distintas especies filogenéticamente cercanas (Lee y Chang, 1994).

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio de la especificidad de la técnica se realizó en muestras de sangre y de músculo de cerdo, pato, pavo, pollo, caprino (10 de cada especie), además de 15 muestras de ovino y 45 de bovino. La extracción de ADN se realizó utilizando la técnica descrita por Lahiri et al. (1992) para las muestras de sangre y el protocolo de Sambrook et al. (1989) para las muestras de músculo.

La pareja de cebadores utilizada para la RAPD-PCR fue diseñada según Calvo et al. (2000a).

Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un volumen de 50 µl, con las condiciones de amplificación descritas por Calvo et al. (2000c). La visualización de los resultados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y bajo la luz ultravioleta.

La sensibilidad de la técnica se realizó mediante diluciones de ADN en cada una de las especies estudiadas, con una cantidad de ADN de 250, 100, 50, 25, 10 y 5 pg/µl.

Por último se testó la capacidad de la técnica para reproducir los resultados en productos alimenticios. Para este fin se utilizaron 30 patés (10 de cerdo, 10 de pato, 6 de cerdo-pato, 3 de oca y 1 de aves), y 25 quesos (6 de vaca, 4 de oveja, 4 de cabra, 4 de vaca-oveja, 3 de vaca-cabra, 1 de oveja-cabra, 3 de vaca-cabra-oveja). Para la extracción de ADN de patés se utilizó la metodología expuesta por Sambrook et al. (1989). Para la extracción de ADN de quesos se utilizó el protocolo descrito por Calvo et al. (2000b) El ADN extraído se disolvió en TE. [Tris (10 mM) – EDTA (1.0 mM), pH 7.5]. Las condiciones de amplificación y electroforesis fueron las mismas que en el caso de las muestras de sangre y músculo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la realización del RAPD-PCR, los perfiles obtenidos fueron analizados visualmente, siendo reproducibles en todas las muestras testadas bajo las mismas condiciones. Los cebadores utilizados mostraron un perfil específico para cada una de las especies estudiadas. Por ejemplo, en los rumiantes aparecen dos bandas específicas en bovino de 290 y 310 pb, una de 750 en ovino y de 340 en caprino, apareciendo otros perfiles específicos para cada una de las especies estudiadas.

Tras realizar las diluciones de ADN, se detectó en las especies porcina, pollo, pato y pavo hasta una dilución de 1/1000 y en las especies ovina, caprina y bovina hasta una dilución 1/10000.

En cuanto a la identificación de especies en distintas matrices alimenticias, Rossen et al. (1992) consideran la extracción de ADN de quesos y otras matrices alimenticias como un problema en el momento de utilizar ese ADN como diana en un PCR. En las condiciones de nuestra experiencia con los métodos de extracción de ADN utilizados obtuvimos un ADN de calidad, para utilizarlo en la RAPD-PCR.

Los perfiles obtenidos para cada una de las especies, mostraron el mismo patrón que en el caso de las muestras de sangre. Quesos y patés compuestos por más de una especie, mostraron la suma de los perfiles individuales de esas especies. Por ejemplo, en un queso mezcla de vaca y oveja, se detectaron las bandas específicas de bovino (290 y 310 pb) y de ovino (750 pb).

Por último, destacar que en el caso de los patés se detectaron fraudes por introducción de cerdo y pollo en patés etiquetados como puros de pato.

Como conclusión, el método RAPD-PCR descrito resulta idóneo para la detección de fraudes económicos por sustitución de especies de alto valor económico por otras de menor valor económico. Además, de ser útil para la detección de fraudes sociales por introducción de productos animales en alimentos destinados a vegetarianos y naturistas, y fraudes sanitarios como por ejemplo la encefalopatía espongiforme bovina que hace que determinados grupos de población no quieran consumir productos bovinos. Por último, es interesante destacar los fraudes según creencias religiosas por las cuales Judíos y Árabes no desean consumir productos que contengan cerdo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Calvo, J.H., Osta, R. y Zaragoza, P. Método para la búsqueda de marcadores de ADN altamente repetidos en el genoma mediante amplificación al azar. Febrero 2000a. España. P200000838.
- Calvo J. H., Osta R., Zarazaga I. y Zaragoza P. (2000b). DNA Fingerprinting for Detection of Bovine, Ovine and Caprine Cheese. Journal of Dairy Research. (enviado).

- Calvo, J.H., Zaragoza, P. y Osta, R. (2000c). Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprints for Identification of Pâté Poultry Species. Poultry Science. (en prensa).
- Lahiri, D.K., Bye, S., Nurnberger, J.I. Jr, Hodes, M.E. y Crisp, M. (1992). A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic ADN from whole blood samples than do nine other methods tested. J. Biochem. Methods, 25 (4): 193-202.
- Lee, J.C. y Chang, J.G. (1994). Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) fingerprints in forensic species identification. Forensic Sci. Int., 67 (2): 103-107.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K. y Rasmussen, O.F. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extractions solutions. Int. J. Food Microbiol., 17: 37-45.
- Sambrook, J, Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.