TRAZABILIDAD DE LA CARNE DE VACUNO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE 17 MARCADORES MICROSATÉLITE DE ADN

Viana J.L., Bouzada J.A., Prado C., Areán H., Muíño R., López M. y Fernández A.

Laboratorio de Xenética Molecular. Xenética Fontao S.A., Fontao-Esperante, Apdo 128. 27080 Lugo (España). labxenmol@xeneticafontao.com

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los sistemas de trazabilidad o rastreabilidad aplicados para identificar a los animales, consignar sus desplazamientos y rastrear el origen de los productos pecuarios han experimentado un notable desarrollo. Recientes episodios sobrevenidos en Europa, como las crisis provocadas por la Encefalopatía Espongiforme Bovina o la Fiebre Aftosa, han afectado gravemente al comercio y puesto de relieve la necesidad de mejorar los métodos para el rastreo de los animales vivos y sus productos. En la Unión Europea, se han promulgado textos legislativos para aplicar mecanismos de rastreo que permitan conferir mayor seguridad a la sanidad animal, la salud pública, el comercio internacional y la certificación (Vallat B., 2001).

Los consumidores se preocupan cada vez más por la calidad de los productos alimenticios, su origen e integridad a través de la cadena alimentaria hasta el consumo. Se pueden aplicar diferentes procedimientos para asegurar el origen de los productos animales, como la doble identificación auricular, pasaporte, identificación de canales, etiquetas certificadoras, etc., no obstante, la verificación de actividades fraudulentas necesita de importantes esfuerzos, en las estrategias de control y en las técnicas para verificar “a posteriori” el origen de la carne. (Arana y cols., 2002).

Los sistemas de certificación de calidad como son las indicaciones geográficas, denominaciones de origen protegidas y especialidades tradicionales garantizadas, deben ser instrumentos que den respuestas a las mismas, ofreciendo máximas garantías e información objetiva a los consumidores y agentes económicos del sector dedicados a la comercialización de los alimentos. Galicia cuenta desde el año 1989 con la Indicación Geográfica Protegida Ternera Gallega, la carne comercializada bajo el amparo de esta I.G.P. es exclusivamente de terneros nacidos, criados y sacrificados en esta Comunidad Autónoma, que proceden de animales de las razas autóctonas gallegas y sus cruces. En todo el proceso productivo, que abarca desde el nacimiento de los terneros, su crianza, alimentación y cuidados sanitarios, hasta su sacrificio y presentación de la carne en los puntos de venta, Ternera Gallega sigue un riguroso programa de control integral, de acuerdo con lo establecido en la legislación vigente.

Cada animal difiere de sus congéneres por ser portador de una combinación única de ácido desoxirribonucleico (ADN), cuya trascripción engendra variaciones a nivel de las proteínas, lo que da origen a la diversidad individual que se expresa físicamente. En los últimos años, acceder al código genético de un animal ha dejado de presentar especial dificultad, la evolución de las técnicas de identificación biológica, ha generado un elemento de gran utilidad para el rastreo de los animales vivos y de los productos de origen animal. El uso de los marcadores de ADN

representa una herramienta útil para la identificación individual y, en consecuencia, para la identificación de la carne. (Cunningham y Meghen, 2001).

En el presente trabajo se presentan los primeros resultados obtenidos de la puesta a punto de un sistema para la realización de ensayos de trazabilidad de carne de vacuno, sacrificada bajo la Indicación Geográfica Protegida Ternera Gallega, mediante el análisis de 17 marcadores microsatélites de ADN.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo, se han analizado un total de 400 muestras biológicas de animales sacrificados por la Indicación Geográfica Protegida Ternera Gallega, realizando el muestreo en dos puntos de control diferentes con el objetivo de establecer un sistema lo más eficaz posible y, que a su vez, interfiera lo mínimo en las prácticas de trabajo rutinarias que se llevan a cabo en la industria cárnica. De esta manera, se tomaron muestras de 100 canales en matadero, que se denominaron muestras de referencia, y 300 muestras, tres por canal, en diferentes puntos de venta (comercio detallista y otras áreas comerciales mayores), que se denominaron muestras de verificación o control.

Se realizó la extracción de ADN a partir del material biológico muestreado, que consistió fundamentalmente en muestras de pabellón auricular, sangre y raíces de pelo, en el caso de las canales, y muestras de distintas piezas cárnicas en los puntos de venta. El método de extracción se realizó siguiendo el protocolo descrito por Gentra Systems, Inc., para sangre entera (Generation® DNA Purification System: Capture Column™ Kit) y, para tejidos, el descrito por Applied Biosystems (NucPrep™ Chemistry: Isolation of Genomic DNA from Animal and Plant Tissue), empleando el equipo PrepStation ABI PRISM® 6100.

Para realizar la identificación genética o genotipado de las muestras, se ha diseñado una PCR multiplex, empleando un termociclador Dual 96W Geneamp PCR System 9700 de Applied Biosystems, analizando 17 loci microsatélite (BM1818, BM1824, BM2113, CSRM60, ETH3, ETH10, ETH185, ETH225, ILSTS006, INRA005, INRA023, INRA063, SPS115, TGLA53, TGLA122, TGLA126 y TGLA227), incluidos en la lista propuesta por la F.A.O. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) en estudios de biodiversidad en ganado vacuno y la I.S.A.G. (Sociedad Internacional para la Genética Animal) en los Test de Comparación Internacional de ADN Bovino organizados por esta sociedad en los últimos años. El tamaño y la nomenclatura alélica de los microsatélites, se realizó ajustándonos al de la muestra de referencia del test de comparación internacional ISAG 2001-2002 y siguiendo las recomendaciones de esta Sociedad (http://www.I.S.A.G..org.uk/).

El análisis de los polimorfismos de los microsatélites se realizó mediante electroforesis capilar de fragmentos de ADN marcados por fluorescencia, en el analizador genético ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer y empleando el software de análisis GeneMapper™ de Applied Biosystems. Para la verificación de la trazabilidad entre las muestras de referencia y las de verificación o control hemos diseñado una base de datos, que nos permite relacionar la información resultante del genotipado de los marcadores microsatélite propuestos y emitir un informe con los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las 400 muestras biológicas estudiadas, se ha conseguido extraer el ADN de los diferentes tipos de tejido y amplificar los 17 microsatélites propuestos. Se han analizado tres muestras de verificación o control (punto de venta) por cada muestra de referencia (matadero), y solamente en dos de las 100 canales muestreadas hemos detectado diferencias entre el genotipo de la muestra de referencia y las de control, no existiendo problemas de trazabilidad en las 98 restantes.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para los 17 marcadores microsatélite en cuanto al número de alelos y rango alélico, en las 400 muestras analizadas. Es necesario tener en cuenta que, dado que se verificó la trazabilidad en 98% de las canales, realmente estos datos corresponden a 102 muestras con diferente genotipo. Además se presentan los marcajes y colores empleados para el análisis en el ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer y el par cromosómico donde se localizan los marcadores.

Tabla 1. Marcadores microsatélite analizados. Rango alélico y número de alelos encontrados

Marcador	Cromosoma	Marcaje	Color	Rango (*)	Nº alelos
CSRM60	10	6-FAM™	Azul	93-107	6
INRA005	12	6-FAM™	Azul	118-124	4
INRA063	18	6-FAM™	Azul	176-186	6
BM1818	23	6-FAM™	Azul	252-276	7
TGLA126	20	VIC™	Verde	113-125	6
TGLA122	21	VIC™	Verde	137-183	13
INRA023	3	VIC™	Verde	196-218	8
ILSTS006	7	VIC™	Verde	287-303	9
ETH3	19	NED™	Amarillo	109-131	6
ETH225	9	NED™	Amarillo	140-158	7
BM1824	1	NED™	Amarillo	178-190	6
ETH185	17	NED™	Amarillo	220-240	9
TGLA227	18	PET™	Rojo	77-103	10
BM2113	2	PET™	Rojo	121-143	8
TGLA53	16	PET™	Rojo	154-190	10
ETH10	5	PET™	Rojo	209-225	6
SPS115	16	PET™	Rojo	242-260	6

(*) Ajustado al de la muestra de referencia del test de comparación internacional ISAG 2001-2002

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arana, A., Soret, B., Lasa I. and Alfonso L. (2002). Meat traceability using DNA markers: application to the beef industry. *Meat Science* 61 (2002): 367–373.

Cunningham, E.P. & Meghen, C.M. (2001). Rastreabilidad de animales y productos de origen animal. Sistemas de identificación biológica: marcadores genéticos. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,* 2001, 20 (2): 491-499.

Vallat, B. (2001). Rastreabilidad de animales y productos de origen animal. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20 (2): 361