

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Estandarización e implementación de una prueba rápida de detección molecular en tiempo real de especies pelágicas, costeras y animales terrestres (ave y bovino) potencialmente indicadoras de contaminación en harina de pescado”

Tesis para optar el Título Profesional de:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Liseth Lucero Huamanca Pulido

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA – PERÚ

2017

A Dios, que me ha dado fortaleza para continuar y llegar a este momento importante en mi vida. A mis padres, por todo su esfuerzo, apoyo incondicional y amor, sé que donde estén siempre guiarán mi camino. Todos mis logros son para ustedes. Gracias a las personas que amo por sus palabras de aliento.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Veterinaria y Zootecnia y docentes que ayudaron en mi formación universitaria. A Innovate Perú mediante el proyecto financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú), de acuerdo al contrato 113-PNICP-PIAP-201. A mis asesores de tesis, Dra. Marcela Mora y Dr. Carlos Shiva, por su tiempo, conocimientos, paciencia y apoyo brindado en el desarrollo de esta investigación, mil gracias.

ABSTRACT

Fishmeal is an important commercial product because it is included in the feed for livestock and poultry because it presents a high amount of protein. It is obtained by processing bones and whole fish, eliminating most water. But often the process is not respected, because in the preparation are added inputs not allowed globally as animal meal of terrestrial animals like poultry, cattle, sheep among others and others prohibited by Peruvian legislation that are destined for direct human consumption (Supreme decree N° 015 2007 PRODUCES article 134 numeral 81); according to Peruvian regulations, the only input to be used for the preparation of fishmeal is anchoveta. Therefore, the purpose of this work is the detection and molecular characterization of pelagic and coastal aquatic species such as bonito (*Sarda chiliensis*), mackerel (*Scomber japonicas*), horse mackerel (*Trachurus picturatus*), ayanque (*Cynoscion analis*), hake (*Merluccius gayi*) and terrestrial species such as poultry (*Gallus gallus domesticus*) and bovine (*Bos taurus*) for the development of molecular protocols, to identify these species as the main indicators of contamination or adulteration in fishmeal, these protocols were standardized and validated. The methodology used was based on qPCR SYBR green I, which allows us to detect double-stranded DNA in real time, providing quantitative results of each species under study. The technique developed presented 100% sensitivity, specificity and precision for the detection of contaminating species in fishmeal with detection limits of 0.000141 ng μl^{-1} to 0.0282 ng μl^{-1} and obtaining amplification efficiencies between 90 % and 100 %, being of great help because it is a method of rapid and specific detection, able to certify the purity of the product can be applied by the competent regulatory authorities, as well as by the companies involved in the export and domestic market of the product.

Key words: qPCR, pelagic, coastal, fishmeal

RESUMEN

La harina de pescado es un producto comercial importante ya que se incluye en la alimentación de ganado y aves de corral debido a que presenta una alta cantidad de proteínas. Se obtiene mediante el procesamiento de los huesos y pescado entero, eliminando así la mayor parte de agua. Pero a menudo el proceso no es respetado, debido a que en la preparación se agregan insumos no permitidos mundialmente como harinas de animales terrestres como aves, bovinos, ovinos entre otros y otros prohibidos por la legislación peruana que están destinados para el consumo humano directo (decreto supremo N° 015 2007 PRODUCE en su artículo 134 numeral 81); según normativa peruana el único insumo que debe ser usado para la preparación de harina de pescado es la anchoveta. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es la detección y caracterización molecular de especies acuáticas pelágicas y costeras, como bonito (*Sarda chiliensis*), caballa (*Scomber japonicas*), jurel (*Trachurus picturatus*), ayanque (*Cynoscion analis*), merluza (*Merluccius gayi*) y terrestres como ave (*Gallus gallus domesticus*) y bovino (*Bos Taurus*) para el desarrollo de protocolos moleculares, que permitan identificar estas especies como principales indicadores de contaminación o adulteración en la harina de pescado, estos protocolos fueron estandarizados y validados. La metodología usada fue en base a qPCR SYBR green I, el cual nos permite detectar ADN bicatenario en tiempo real, proporcionando resultados cuantitativos de cada especie en estudio. La técnica desarrollada presento 100% de sensibilidad, especificidad y precisión para la detección de especies contaminantes en harina de pescado con límites de detección de $0.000141 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ hasta $0.0282 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ y obteniendo eficiencias de amplificación entre 90 y 100%, siendo de gran ayuda ya que es un método de detección rápida y específica, capaz de certificar la pureza del producto pudiendo ser aplicado por las entidades reguladoras competentes, así como por las empresas implicadas en la exportación y mercado interno del producto.

Palabras claves: qPCR, pelágicas, costeras, harina de pescado

INTRODUCCIÓN

A finales del año 1980, se presentaron y confirmaron casos de encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en todo el norte de Europa, debido a que es una enfermedad transmisible, se vinculó al consumo de alimentos balanceados contaminados por proteínas de rumiantes infectados en forma de proteína animal transformadas como harina de carne y hueso, conllevando a que la Unión Europea prohíba la harina de pescado en la alimentación (Bachur S., 2014, Parker T., 2015)

Al revelarse que la transmisión también podía llegar a los humanos a través del consumo de carne contaminada, se hizo una suspensión total del uso de proteína animal transformada en los alimentos balanceados para animales de granja. Se realizaron estudios por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en el cual concluyeron que la harina de pescado sea admitida como alimento balanceado en animales no rumiantes como pollos y cerdos, prohibiendo que fábricas de alimentos balanceados para múltiples especies realicen la elaboración de dietas para rumiantes y no rumiantes. (Parker T., 2015).

Debido a los problemas de contaminación, Food and Drug Administration (FDA) publicó la regulación 21 CFR 589.2000 mediante la cual prohibía la alimentación de los animales con alimentos conteniendo proteína animal. En el año 2008 la FDA refuerza su normatividad ampliando la prohibición a tejidos de alto riesgo como cerebro y médula espinal de vacuno. Similarmente las autoridades sanitarias de la comunidad Europea emitieron la directriz CE 999/2001 regularon la comercialización y uso de harina de pescado en la alimentación animal y estableciendo la prohibición de la proteína de rumiantes en su composición. (CFR - code of federal regulations, 2015)

En el año 2001, se funda la International Fishmeal and Fish Oil Organization (IFFO), de la cual el Perú es miembro fundador, donde uno de los temas a tratar fue sobre los contaminantes que se encontraban en la harina de pescado, y los reportes de casos de EEB (encefalopatía espongiiforme bovina) (IFFO, 2013). A partir de ello, los países importadores de harina de pescado solicitaron la implementación de técnicas para detectar la contaminación por proteína animal de la harina de pescado a sus respectivos gobiernos y a sus proveedores. Siendo esto importante, ya que el Perú es el principal país productor y exportador de harina de pescado, dadas las proyecciones de producción y precio, ocurrió un incremento de las exportaciones de harina de pescado cercano al 12% a US\$ 1,460 millones en el 2015, según diario Gestión - columna economía (2015).

Según la normativa peruana se establece que la anchoveta es el principal y único insumo usado en la preparación de harina de pescado. El decreto supremo N° 015 2007 PRODUCE en su artículo 134 numeral 81 regula la prohibición de procesar los recursos hidrobiológicos sardina, jurel y caballa para la elaboración de harina de pescado, así como descargar dichos recursos biológicos en establecimientos industriales pesqueros destinados al procesamiento de harina, en el Capítulo III se establecen las sanciones para los infractores a la norma, con la finalidad de proteger las especies de consumo humano (Ministerio de la Producción, 2007). Sin embargo, esta Norma no es respetada por los pescadores y empresas harineras. Por estas razones es importante contar con técnicas de detección de contaminación por especies acuáticas prohibidas por la norma peruana y de proteína animal prohibida mundialmente con alta sensibilidad, especificidad y con resultados en un corto tiempo.

Existen varias técnicas para la detección de contaminantes en harinas, una de las primeras en desarrollarse fue la microscopia clásica, de acuerdo a la directiva 2003/126/EC de la Unión Europea, según The Commission of the European Communities (2003), esta prueba presenta un límite de detección

menor al 0.1%, y permite detectar componentes de origen animal y proteínas de animales terrestres. Sin embargo presentaba dificultades para detectar la especie animal específica de la partícula muestreada, el tiempo y laboriosidad que tomaba este examen. Luego se desarrolló la técnica de espectroscopia del infrarrojo acoplado al microscopio (NIRM), que tenía como objetivo determinar el origen de las partículas animales y diferenciarlas como especies acuáticas de las terrestres presentes en la harina de pescado. Sin embargo, solo da una indicación del origen de las partículas detectadas y cuando se ponen diferentes grupos se dificultaba la lectura, además este examen presenta un alto costo. Posteriormente se desarrolló la prueba inmunológica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) y tiras reactivas de flujo lateral, la primera es una técnica analítica basada en la reacción específica entre un antígeno y anticuerpo, y en la segunda prueba se agregan reactivos en un medio sólido y mediante el flujo de capilaridad de la muestra se determina la presencia de proteínas específicas. Sin embargo, presentan casos de falsos negativos y hay una pérdida de la sensibilidad para la identificación de proteínas que pasaron previamente por un tratamiento térmico (Bachur S., 2014).

Con el desarrollo de la técnica molecular de la PCR, se introdujo esta tecnología a la detección de genes específicos con un alto valor forense, mejorando su eficiencia cuando se empleaba PCR-RFLP (Fumiére, et al., 2009). Esta prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ayudaría en la detección de ADN, permitiendo desarrollar protocolos con alta especificidad y sensibilidad para producir miles de secuencias específicas de un ADN blanco, esta prueba se basa en la fluorescencia cuantitativa en tiempo real, detectando y cuantificando pequeñas cantidades de ácidos nucleicos en una amplia gama de muestras de diferentes tomas de muestra (Stephen B., et al., 2009), lo que ayuda posteriormente a analizar y encontrar réplicas de la especie contaminante al compararlas con los productos encontrados en la harina de pescado.

Debido a las dificultades que presentan las diferentes técnicas de detección, se buscó realizar una prueba molecular de detección rápida con alta sensibilidad, especificidad y límite de detección, capaz de detectar las especies pelágicas, costeras y terrestres no permitidas en la harina de pescado reduciendo significativamente el costo y tiempo de ejecución del ensayo permitiendo desarrollar posteriormente un método capaz de detectar las especies mencionadas utilizando como matriz la harina de pescado, y así el país obtenga un producto certificado de alta calidad y libre contaminación ya sea para la exportación o la distribución local.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Laboratorio de Biología Molecular, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (FAVEZ – UPCH).

Tipo de estudio

Estudio experimental

Recolección de muestras

Las muestras de caballa (*Scomber japonicus*), anchoveta (*Engraulis ringens*), bonito (*Sarda sarda chilensis*), jurel (*Trachurus picturatus*), ayanque (*Cynoscion analis*), merluza (*Merluccius gayi*), aves (*Gallus gallus domesticus*) y bovinos (*Bos taurus*) fueron recolectadas de los diferentes centros de abastecimiento como supermercados y terminales pesqueros de Lima y del norte del país, y se trasladaron manteniendo la cadena de frío al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Cayetano Heredia.

Procesamiento de muestra y extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con 30 mg de tejido muscular de cada especie, utilizando el kit “Axyprep multisource genomic DNA miniprep kit” (Axygen®, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del ADN se midió con un espectrofotómetro (A260/A280) Nanodrop Lite (Thermo Scientific®, USA). Los productos obtenidos se conservaron a -20°C.

qPCR en tiempo real

Se estandarizó y validó un protocolo universal de PCR en tiempo real para la detección de las 6 especies acuáticas utilizando ABsolute qPCR SYBR Green (Thermo Scientific®, USA) utilizando primers

de métodos ya desarrollados para caballa - *Scomber japonicus* (Infante et al., 2006), anchoveta - *Engraulis ringens* (Chairi et al., 2014); bonito - *Sarda sarda chilensis* (Rehbein H. et al., 1995), jurel - *Trachurus picturatus* (Apostolos P. et al., 2008). Los primers utilizados para cachema - *Cynoscion analis* y merluza - *Merluccius gayi* fueron diseñados en el laboratorio con regiones altamente conservadas del gen Cyt b. La detección de aves y bovinos se llevó a cabo siguiendo el método qPCR dúplex desarrollado por Muhammad S. y col. (2013). Las secuencias y genes trabajados para todas las especies se describen en el cuadro 3.

El master mix para aves (*Gallus gallus domesticus*) y bovinos (*Bos taurus*) fue ajustado en un volumen final de 12.5 µl, 0.08 µM y 0.3 µM de primers para aves y bovinos respectivamente, siguiendo el protocolo de desnaturalización inicial 95°C x 15 min., 95°C x 30 segundos, 60°C x 30 segundos y 72°C x 30 segundos por 40 ciclos, y una curva de disociación de 72-95°C de 1°C/5s.

La concentración de primers utilizados para las especies acuáticas como bonito, merluza, anchoveta y ayanque fue de 0.5 µM y 0.3 µM para jurel y caballa, con un paso de desnaturalización inicial de 94°C x 10 min, seguido de 40 ciclos de 94°C x 45 segundos, 58°C x 45 segundos, 72°C x 1 min y una extensión final de 72°C x 10 min. El PCR fue realizado utilizando el termociclador en tiempo real LightCycler 96 (ROCHE®, Suiza) y los resultados se analizaron en función a los valores del ciclo de amplificación (Cq) y temperatura de disociación (T^m) obtenido con el software 1.1.

Elaboración de controles positivos y secuenciamiento

El producto PCR de las muestras trabajadas fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, las bandas de ADN con el tamaño de bp deseado fueron purificadas con el kit AxyPrep DNA Gel Extraction (AXYGEN® Biosciences, USA) y secuenciadas (Macrogen®, Korea).

Estandarización y Validación del qPCR

Para optimizar la sensibilidad y especificidad de la técnica se realizaron, curvas de Mg^{2++} de 0.3 mM a 3 mM, $T^{\circ}m$ de 50 a 62°C y se probaron concentraciones de primers desde 0.08 μM a 0.5 μM .

Las curvas estándar se trabajaron con diluciones decimales seriadas 1:10 por triplicado, utilizando el ADN de cada especie previamente cuantificado y secuenciado.

Los parámetros aceptados para la curva estándar fueron; una pendiente ideal de -3.32 con un coeficiente de correlación (R^2) mayor o igual a 0.98. La eficiencia de amplificación fue calculada por la siguiente ecuación: $E = [10 (-1 / pendiente) -1] \times 100\%$. El límite de detección práctico del método se consideró como la menor concentración de blanco que se puede detectar de forma reproducible en 10 repeticiones con un intervalo de confianza del 95%.

La especificidad teórica de los primers fue corroborada con el programa informático de alineamiento de secuencias (BLASTn) utilizando la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). La sensibilidad del método fue comprobada de manera reproducible en 10 muestras con presencia y ausencia del target al igual que la especificidad de los primers ante una posible reacción cruzada.

Plan de análisis de datos

Para el análisis de la data, se utilizó el paquete estadístico Minitab versión 16 utilizando un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Procesamiento de muestras y extracción de ADN

Se obtuvo una recuperación promedio de ds ADN de 16.32 ± 6.00 ng/ μ l con un grado de pureza A260/A280 de 2.05 ± 0.07 ng/ μ l para las muestras de aves; en bovino la recuperación de dsADN fue de 36.48 ± 21.53 ng/ μ l con una de pureza A260/A280 de 1.75 ± 0.275 ng/ μ l. En las especies acuáticas el promedio de recuperación de ADN fue de 23.85 ± 17.32 ng/ μ l y un grado de pureza A260/A280 de 1.84 ± 0.41 ng/ μ l (Cuadro 1 y 2).

qPCR en tiempo real

La amplificación de las especies trabajadas se representan con una curva sigmoidea por arriba del umbral y ≤ 40 Cq (crossing points o punto de cruce) (Figura 1 y 2). Para discriminar entre especies se evaluó la temperatura de Melting – Tm °C de cada producto con el valor Cq máximo determinado (cuadro 3), los picos de melting pueden se muestran en las figuras 3 y 4.

El tamaño de banda de cada producto se detalla en el cuadro 3 y las bandas visualizadas en el gel de agarosa en las figuras 5 y 6.

Elaboración de controles positivos y secuenciamiento

Los resultados del secuenciamiento fueron trabajados con el software informático BioEdit Sequence Alignment 7.2.5 version utilizando la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) se determinó que las secuencias trabajadas son 100 % homologas a las especies de interés, no presentando reacción cruzadas con otras especies cercanas.

El control positivo de aves presentó una concentración de 23.5 ng/μl ADN, 58.3 ng/μl ADN bovino, 28.2 ng/μl ADN jurel, 36.1 ng/μl ADN bonito, 23 ng/μl ADN caballa, 14.9 ng/μl ADN ayanque, 14.5 ng/μl ADN merluza, y 18.2 ng/μl ADN anchoveta.

Estandarización y Validación del qPCR

Las concentraciones más adecuadas de Mg^{2+} fueron de 2 mM (bonito, anchoveta, caballa, ayanque) y 2.5mM (jurel y merluza), en los primers fue de 0.3 μM para jurel, caballa y bovino, 0.5 μM para bonito, merluza, anchoveta, ayanque y 0.08 μM para ave. La $T^{\circ}m$ ideal fue 60°C en especies terrestres (ave y bovino) y 58°C en especies acuáticas. Utilizando estos parámetros se logró, una mayor sensibilidad y especificidad de la prueba.

Las pendientes de las curvas estándar para las especies acuáticas y terrestres oscilan entre -3.3035 y - 3.5893, con un coeficiente de regresión (R^2) mayor a 0.99 en todas las curvas trabajadas para cada especie (figura 7). Todos los qPCR desarrollados para cada especie tuvieron eficiencias de amplificación entre el 90% y 100%. (Cuadro 4).

Se evaluaron los valores de amplificación (C_q) para cada especie, a modo de establecer un rango C_q límite para cada target y discriminar de aquellos valores correspondientes a productos inespecíficos (cuadro 3).

El método desarrollado presenta un límite de detección práctico de 0.00116 ng μl^{-1} ADN merluza, 0.0282 ng μl^{-1} ADN jurel, 0.00361 ng μl^{-1} ADN bonito, 0.00181 ng μl^{-1} ADN anchoveta, 0.00149 ng μl^{-1} ADN ayanque, 0.0023 ng μl^{-1} ADN caballa, 0.00583 ng μl^{-1} ADN bovino y 0.000141 ng μl^{-1} ADN ave.

Se realizaron 10 ensayos en cada una de las especies utilizadas a fin de determinar la especificidad y sensibilidad del método. Sólo las muestras que contenían el target deseado amplificaron, por lo que el método desarrollado demostró ser 100% específico, preciso y sensible para cada especie.

Cuadro 1: Concentración y pureza de ADN extraído de las especies terrestres (ave y bovino)

	Muestra	Conc.	Unit.	Factor	A260 (10mm)	A280 (10mm)	A3rd (10mm)	A260/A280
Ave	19/11/2015	9,4	ng/ul	50.0	0.188	0.090	0.017	2.10
	31/03/2016	23,5	ng/ul	50.0	0.471	0.243	0.048	1.94
	20/04/2016	14,1	ng/ul	50.0	0.282	0.134	0	2.1
	20/04/2016	18,3	ng/ul	50.0	0.367	0.175	0.005	2.09
Bovino	19/11/2015	14,3	ng/ul	50.0	0.287	0.143	0.091	2.01
	09/03/2016	14,5	ng/ul	50.0	0.291	0.151	-0.12	1.92
	20/04/2016	13,2	ng/ul	50.0	0.264	0.121	0.015	2.18
	20/04/2016	43,8	ng/ul	50.0	0.875	0.578	0.051	1.51
	13/07/2016	58,3	ng/ul	50.0	1.165	0.752	0.028	1.55
	13/07/2016	55,9	ng/ul	50.0	1.119	0.717	0.018	1.56
	13/07/2016	55,4	ng/ul	50.0	1.109	0.715	0.024	1.55

Cuadro 2: Concentración y pureza de ADN extraído de las especies pelágicas y costeras

	Muestra	Conc.	Unit.	Factor	A260 (10mm)	A280 (10mm)	A3rd (10mm)	A260/A280
Jurel	19/11/2015	14,3	ng/ul	50.0	0.285	0.140	0.011	2.03
	28/01/2016	7,8	ng/ul	50.0	0.156	0.068	0.004	2.28
	23/05/2016	28,2	ng/ul	50.0	0.565	0.365	0.024	1.53
	12/07/2016	7,6	ng/ul	50.0	0.151	0.076	0.012	2
	12/07/2016	7,9	ng/ul	50.0	0.159	0.077	0.006	2.05
Bonito	19/11/2015	15,4	ng/ul	50.0	0.308	0.152	0.017	2.03
	28/01/2016	7,8	ng/ul	50.0	0.156	0.073	0.039	2.13

	12/07/2016	10,8	ng/ul	50.0	0.217	0.138	-0.251	1.57
	12/07/2016	11,4	ng/ul	50.0	0.229	0.142	-0.228	1.61
	10/09/2016	36.1	ng/ul	50.0	0.759	0.134	0.045	1.52
Caballa	14/12/2015	12,5	ng/ul	50.0	0.251	0.122	0.033	2.05
	14/12/2015	15,3	ng/ul	50.0	0.306	0.398	0.046	0.77
	14/12/2015	4,2	ng/ul	50.0	0.084	0.035	-0.012	2.4
	14/12/2015	13,2	ng/ul	50.0	0.265	0.362	0.042	0.73
	28/01/2016	8,8	ng/ul	50.0	0.176	0.079	0.023	2.24
	28/06/2016	23,0	ng/ul	50.0	0.459	0.294	0.376	1.56
	28/06/2016	16,9	ng/ul	50.0	0.339	0.196	0.255	1.73
Ayanque	19/11/2015	14,6	ng/ul	50.0	0.292	0.143	0.014	2.04
	28/01/2016	14,9	ng/ul	50.0	0.297	0.154	0.039	1.93
Merluza	19/11/2015	14,5	ng/ul	50.0	0.291	0.144	0.013	2.02
	28/01/2016	7,9	ng/ul	50.0	0.158	0.073	0.01	2.16
	18/10/2016	11.6	ng/ul	50.0	0.267	0.127	0.02	2.10
Anchoveta	19/11/2015	18,2	ng/ul	50.0	0.364	0.204	0.188	1.78
	28/01/2016	13,9	ng/ul	50.0	0.278	0.146	0.041	1.9

Cuadro 3: nombre científico, gen, primers, bp, Tm °C y Cq de las especies acuáticas y terrestres.

Espece	Nombre científico	Gen	Primers	Bp	Tm °C	Cq
Ave	<i>Gallus gallus domesticus</i>	12S rRNA	Fwd: 5'-GGGCTATTGAGCTCACTGTT-3' Rev: 5'-TGAGAACTACGAGCACAAAC-3'	183	84.98±0.44	31.08±0.75
Bovino	<i>Bos taurus</i>	Cyt b	Fwd: 5'- CAAGAACACTAATGACTAACATTCGAAAG-3' Rev: 5'-AAATGTTTGATGGGGCTGGA-3'	93	78.19±0.41	27.09±0.50
Anchoveta	<i>Engraulis ringens</i>	5S rDNA	Fwd: 5'TGAAAAAGGGAATGGGGTTT-3' Rev: 5'-CGGTCCTTTTAGGGTTAGGG-3'	250	84.54±0.13	31.74±2.15
Ayanque	<i>Cynoscion analis</i>	Cyt b	Fwd: 5'- CCTCTGCCCCGATGACTTAAT-3' Rev: 5'-CACTTATGTCCGCCTAGACTTAG-3'	106	79.89±0.20	37.71±0.74
Bonito	<i>Sarda sarda</i>	Cyt b	Fwd: 5'-GTC GAA TGA ATC TGA GGA GGC TT-3' Rev: 5'-ATT GGG TTG TTT GAC CCT GTTTC-3'	148	80.98±0.54	32.86±0.43
Caballa	<i>Scomber japonicus</i>	12S rRNA	Fwd: 5'-GCAAAATTGGCACAGCCCAGAACGTCA-3' Rev: 5'-CGGTGTGTACGCACTTCAGAGCCGATT-3'	188	82.82±0.53	30.87±0.45
Jurel	<i>Trachurus picturatus</i>	Cyt b	Fwd: 5'-CTGAAACACCGGAGTCGTT-3' Rev: 5'-CCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	90	78.78±0.38	36.51±0.92
Merluza	<i>Merluccius gayi</i>	Cyt b	Fwd: 5'- CCT CAC TTC CTT TCT CCA AAG A-3' Rev: 5'- GCA GGG ATG CCA GGA ATA A -3'	133	80.13±0.13	33.77±0.46

Cuadro 4: Slope y eficiencia de amplificación de cada especie estudio.

Especie	Y	R ²	Eficiencia de amplificación
Anchoveta	$-3.391x + 20.387$	0.9972	97.20 %
Ayanque	$-3.3227x + 28.438$	0.99	99.97 %
Ave	$-3.5893x + 17.496$	0.9966	90.25 %
Bovino	$-3.3226x + 19.36$	0.9974	99.97 %
Bonito	$-3.3686x + 24.682$	0.9938	98.09 %
Caballa	$-3.3383x + 21.693$	0.9953	99.32 %
Jurel	$-3.3035x + 30.766$	0.9889	100.77 %
merluza	$-3.4199x + 23.64$	0.9942	96.07 %

Figura 1: PCR en tiempo real de Aves y Bovinos. Muestras positivas a ADN de aves (verde), muestras positivas a ADN de Bovino (naranja).

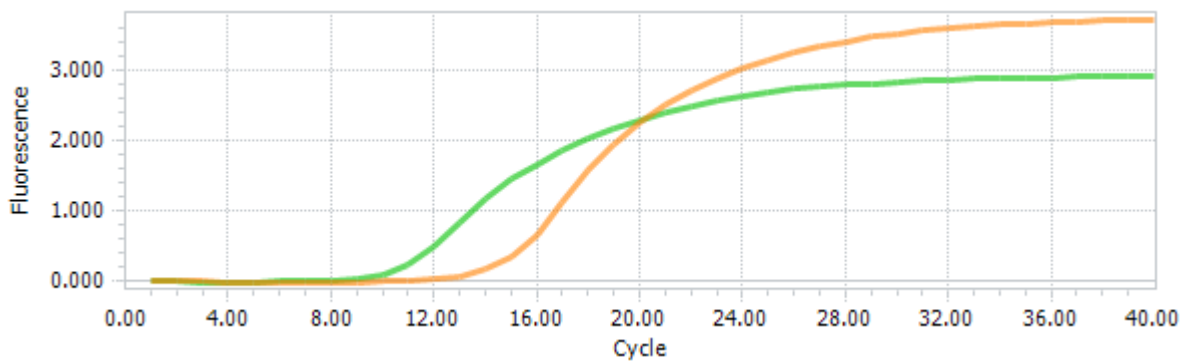


Figura 2: PCR en tiempo real de especies pelágicas y costeras. Muestras positivas a jurel (celeste), ayanque (amarillo), anchoveta (verde), merluza - *Merluccius gayi* (gris) - *Merluza gayi peruanus* (fucsia), bonito (morado) y caballa (naranja). Control negativo (azul).

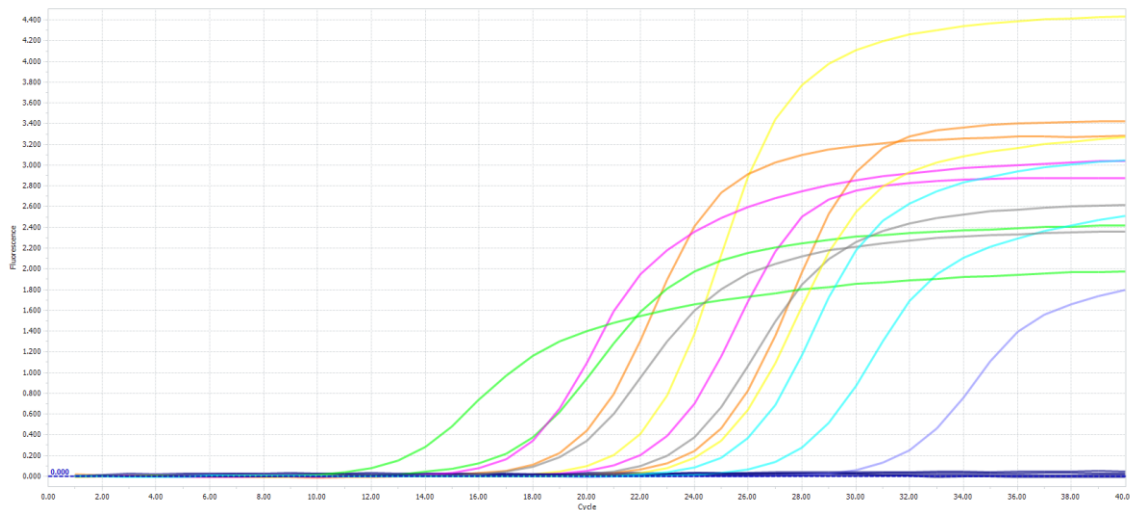


Figura 3: picos de melting de las especies terrestres ave (a) y bovino (b). $T^{\circ}m$ ave 84.98 ± 0.44 °C y bovino 78.19 ± 0.41 °C.

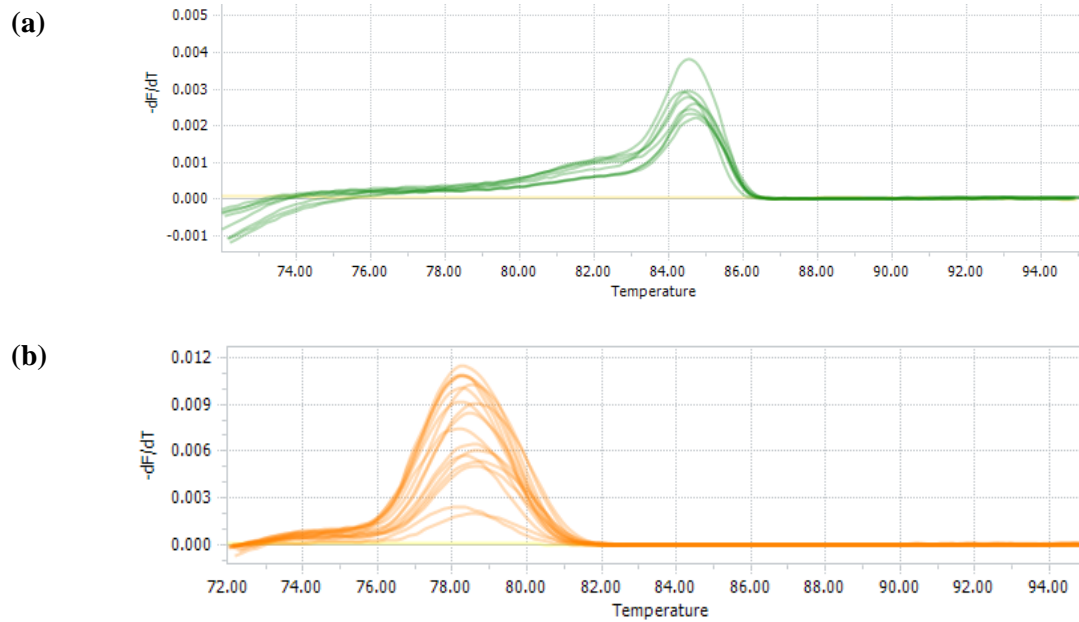
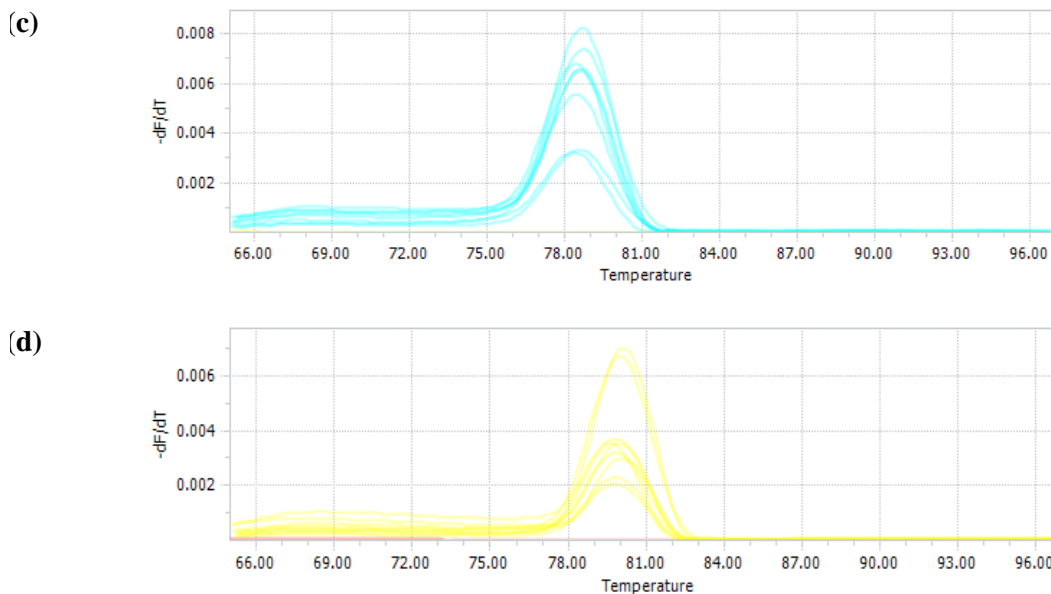


Figura 4: picos de melting de las especies acuáticas jurel (c), ayanque (d), anchoveta (e), merluza (f), bonito (g), y caballa (h). $T^{\circ}m$ anchoveta es de 84.54 ± 0.13 °C, ayanque 79.89 ± 0.20 °C, bonito 80.98 ± 0.54 °C, caballa 82.82 ± 0.53 °C, jurel 78.78 ± 0.38 °C, y merluza 80.13 ± 0.13 °C.



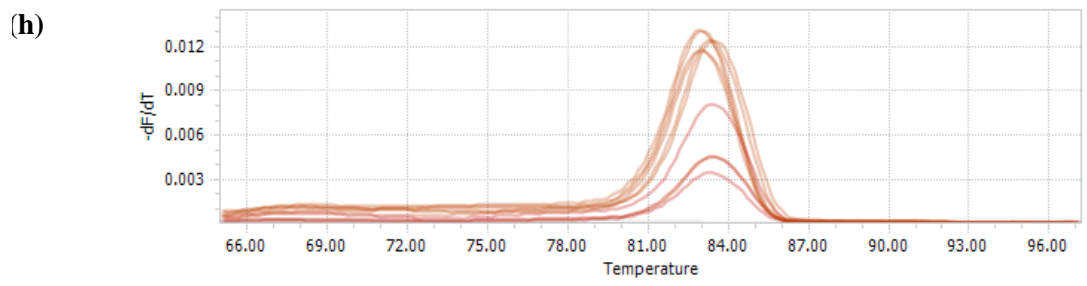
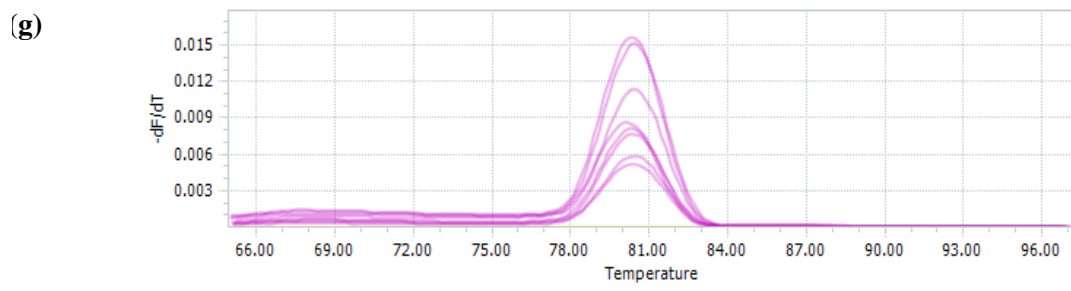
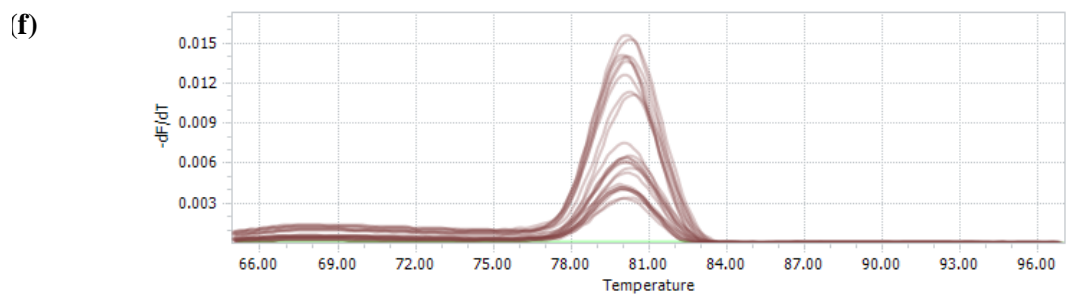
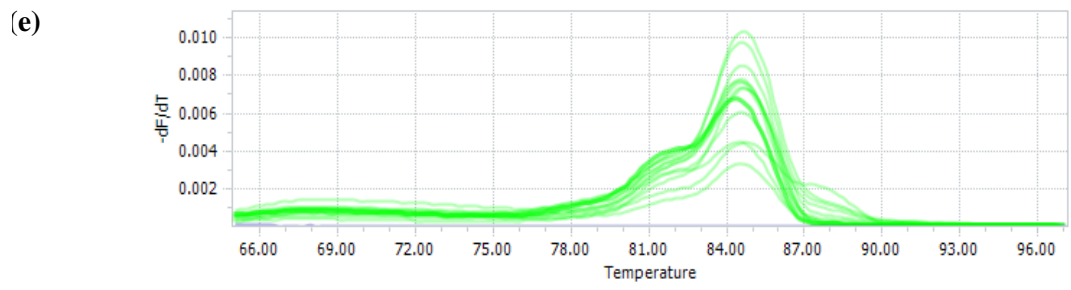


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa 2 %. (a) Ladder 100 bp. (b, e, h). Muestras positivas a ave con un tamaño de banda de 183 bp. (c, f) Muestras positivas a bovino con un tamaño de banda de 93 bp. (d, g) Controles negativos.

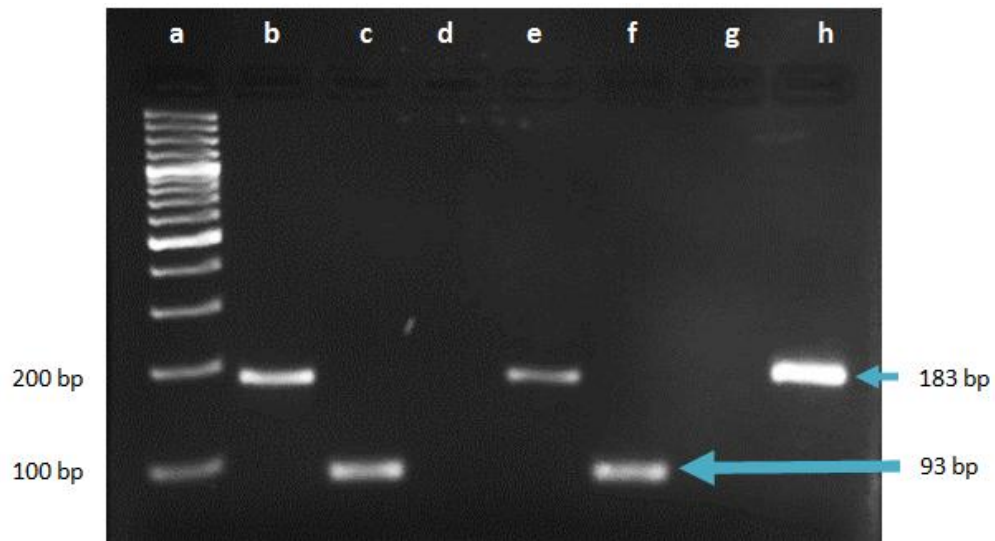


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa 2 %. Muestras positivas de las especies acuáticas (pelágicas y costeras), (a, b) caballa 188 bp, (c, d) bonito 148 bp, (e, f) jurel 90 bp, (g, h) anchoveta 250 bp, (i, j) merluza 133 bp, (k, l) ayanque 106 bp. (C-) Control negativo.

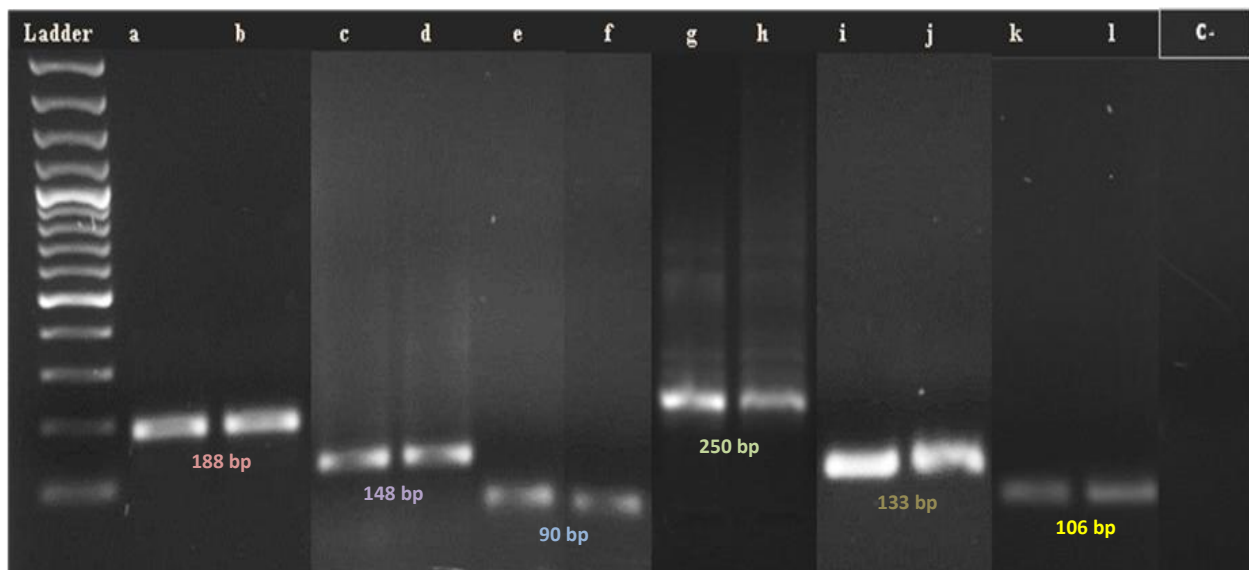
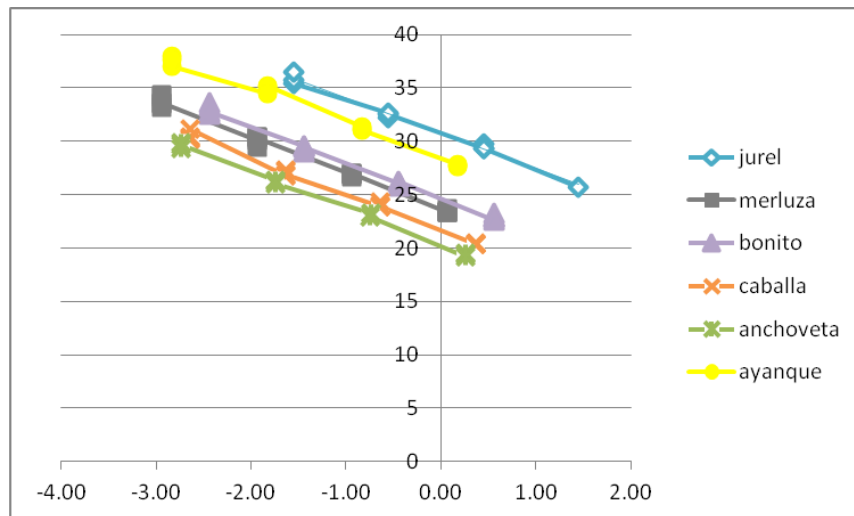
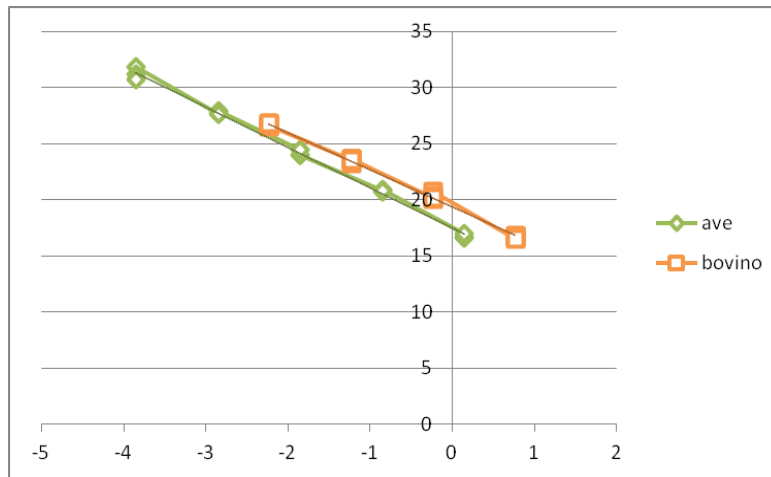


Figura 7: curva estándar de las especies acuáticas y terrestres detectadas en qPCR tiempo real. Los valores medios de Cq se representaron frente a la concentración logarítmica de las copias de ADN (extraído de los tejidos de cada especie).



DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se desarrollaron protocolos para la identificación molecular de 6 especies acuáticas (pelágicas y costeras) y 2 terrestres, las cuales son indicadores de contaminación o adulteración en la producción de harina de pescado, a excepción de la anchoveta, la cuál es la única especie permitida para su producción. Los mercados del mundo demandan cada vez más que la industria pesquera diseñe y aplique medidas para la seguridad y trazabilidad de los productos alimenticios para asegurar que éstos reúnan la calidad suficiente, su autenticidad y estén debidamente identificados y contengan toda la información necesaria. Por ello, la autoridad competente en materia sanitaria pesquera y acuícola y la industria requiere cada vez más técnicas rápidas y fiables para controlar la seguridad de la harina de pescado y prevenir ilícitos. Los protocolos de PCR fueron desarrollados y estandarizados para obtener una prueba universal que permita la identificación simultánea de varias especies en un solo ensayo.

Los resultados para caballa (*Scomber japonicus*) fueron similares a los resultados mostrados por Infante et al. (2006), donde desarrollaron un protocolo para autenticar caballa enlatada, dando como resultado el mismo tamaño de banda, por lo que se usó la misma secuencia y concentración de primers para la prueba del protocolo simultáneo. Lo mismo ocurrió con bonito (*Sarda sarda chilensis*) para lo que se utilizó el protocolo del estudio de Rehbein H. et al. (1995).

El estudio realizado por Apostolos P. et al. (2008), desarrolló un protocolo PCR multiplex para la detección de SNPs específicos para especies congéneres de jurel como la especie *Trachurus*, *Mullus*, y *Trachurus picturatus* sin obtener amplificación cruzada y tamaño de banda de 90 bp similar al obtenido en el presente trabajo.

Los primers para ayanque - *Cynoscion analis* y merluza - *Merluccius gayi* fueron diseñados en el Laboratorio de Biología Molecular, FAVEZ – UPCH para obtener un tamaño de banda de 106 bp y 133 bp respectivamente. No se pudo realizar la comparación con otros estudios de PCR en real time, debido a la escasa información sobre estas especies.

Los resultados de nuestro estudio para anchoveta (*Engraulis ringens*) fueron similares a los resultados reportados por Chairi et al. (2014), obteniéndose una detección específica sin presencia de falsos positivos o negativos. La diferencia entre estos estudios es el uso de PCR-RFLP para la caracterización de especies, en nuestro estudio esto no fue necesario ya que se trabajó con la única especie encontrada en nuestro país, anchoveta peruana, y se obtuvo el mismo tamaño de banda de 250 bp que el autor.

El método desarrollado por Muhammad S. & Yasmeen (2013) para la detección de ave y bovino, indica que la muestra debe pasar por un proceso de autoclavado, al ser aplicado en nuestro estudio, el ADN obtenido tuvo una baja concentración y una rápida degradación. Este punto puede ser una de las razones por la que el resultado de T_m difiere entre ambos estudios en 3°C en el caso de ave y 1°C aproximadamente en bovinos. Los cambios hechos en la concentración de primers y protocolo de ciclamiento nos dieron resultados satisfactorios, los cuales permiten una adecuada diferenciación entre las especies.

El límite de detección, en el estudio de Muhammad S. & Yasmeen (2013), presenta valores tan bajos como 0.0001 ng/ μl^{-1} , mientras que en el presente estudio se obtuvo 0.00583 ng/ μl^{-1} de ADN bovino y 0.000141 ng/ μl^{-1} de ADN ave, esto puede deberse a los reactivos y/o equipos utilizados por Muhammad S. & Yasmeen (2013), un segundo factor puede ser el procesamiento de muestra, debido a que el

protocolo mencionado por este autor, realiza un pre-tratamiento al tejido, el cual es ingresar el tejido animal al autoclave antes de la extracción de ADN.

El método desarrollado tiene un alto potencial como herramienta molecular para utilizarse en laboratorios de control de calidad en piensos como harina de pescado y así verificar los orígenes de la materia prima. Nuestro estudio hace hincapié en la necesidad de técnicas de identificación rápida, altamente sensible, específica y rentable para examinar las harinas de pescado. En última instancia, estos resultados deberían ser de gran interés para la trazabilidad de la harina de pescado, dada la sobreexplotación del mar peruano y períodos de escasez de anchoveta.

La aplicación del protocolo estándar qPCR del presente estudio será verificado en harina de pescado comercial en un posterior estudio.

CONCLUSIONES

El procesamiento y extracción de ADN en muestras de las especies terrestres (ave y bovino) y especies acuáticas (bonito, merluza, caballa, anchoveta, ayanque y jurel) fue apropiado para el modelo utilizado, obteniéndose ADN de buena calidad y con un adecuado promedio de recuperación.

Se logró la identificación de las especies terrestres y acuáticas mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR Green. Una alta sensibilidad, especificidad y precisión de la técnica desarrollada demuestra que es adecuada para la detección de estas especies exógenas en la producción de harina de pescado.

Al ser nuestro país el principal productor de harina de pescado, la falta de técnicas rápidas y precisas representa un gran problema actual, para lo cual la técnica molecular desarrollada es de gran ayuda como un método de detección rápido y específico, capaz de certificar la pureza del producto, pudiendo ser aplicado por las entidades reguladoras competentes, así como por las empresas implicadas en la producción de harina de pescado.

BIBLIOGRAFÍA

- Apostolos P., Georgiadis A., Karaiskou N., Sandaltzopoulos R. (2008, Agosto 04). Reliable and rapid discrimination of congeneric species by mtDNA SNP analysis by multiplex PCR: application on three *Trachurus* and two *Mullus* fish species as model cases. *Hydrobiología*, 614, pp. 401-404. 2015, Noviembre, De Springer Base de datos.
- Bachur Sandra. (2014, Diciembre). Revisión de los principales métodos de detección e identificación de proteínas animales procesadas en alimentos balanceados. SNS - publicación periódica científico tecnológica, n° 5-6, pp. 15-24. 2016, febrero 26, de SENASA base de datos.
- CFR - code of federal regulations. (01 Abril, 2015). Tittle 21 - part 589 - Substances prohibited from use in animal food or feed. Marzo 15, 2016, de FDA - food and drug administration. Sitio web: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=589.2000>
- Chairi H. & Rebordinos L. (Marzo 14, 2014). A Rapid Method for Differentiating Four Species of the *Engraulidae* (Anchovy) Family. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62, pp. 2803–2808. Noviembre 2015, De *Journal of agricultural and food chemistry* Base de datos.
- Diario Gestión - Columna economía. (2015, Enero 21). Pesca de anchoveta mejoraría y exportaciones de harina de pescado crecerían 12% el 2015. *Diario Gestión*, p. 1.
- Fumiére, O., Veys, P., Boix, A., Von Holst, C., Baeten, V., & Berben, G. (2009). Methods of detection, species identification and quantification of processed animal proteins in feeding stuffs. *Biotechnology, agronomy, society and environment*, 13, pp. 57-68
- IFFO. (2013, Febrero). Actividades y eventos de IFFO recientemente atendidos. IFFO- La organización de ingredientes marinos – Update, N°243, pp. 1-3.

Infante, C., Crespo A., Zuasti E., Ponce M., Laura Pérez, Victoria Funes, Catanese G. & Manchado M. (2006, febrero 20). PCR-based methodology for the authentication of the Atlantic mackerel *Scomber scombrus* in commercial canned products. *ELSEVIER*, 39, pp. 1023-1028. 2015, noviembre 15, De ScienceDirect Base de datos.

Ministerio de la producción. (2007, Agosto 4). Modificación del reglamento de la ley general de pesca, aprobado por el decreto supremo n° 012-2001-pe - Decreto supremo n° 015-2007-produce. *El Peruano*, p. 350725.

Muhammad S. & Yameen J. (2014, Octubre 23). Development and validation of fast duplex real-time PCR assays based on sybr green florescence for detection of bovine and poultry origins in feedstuffs. *Elsevier*, 173, pp. 660-664. 2015, noviembre, de food chemistry base de datos.

Parker, Toby. (2015, Agosto). Un comentario sobre nuestra ausencia de mercado (de harina de pescado). *IFFO - La organización de ingredientes marinos - Update*, 272, p. 4.

Rehbein H., Mackie, I.M, Pryde S., Gonzales-Sotelo C., Perez-Martin R., Quinteiro J. & Rey-Mendez M. (1995). Fish species identification in canned tuna by DNA analysis (PCR-SSCP). *Inf. Fischwirtseh.*, 42, pp. 209-212. 2015, Noviembre. De Aquatic commons, base de datos.

Stephen A. B., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl W. M., Shipley L. G., Vandesompele J. & Wittwer T. C. (marzo 27, 2009.). *The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments*. Marzo 15, 2016, de *The Real-time PCR Data Markup Language (RDML)*. Sitio web: <http://www.rdml.org/miqe.php>

The commission of the European communities. (Diciembre 23, 2003). *Commission directive 2003/126/ec of 23 December 2003 on the analytical method for the determination of constituents of animal origin for the official control of feedingstuffs*. Enero 20, 2016, de *eur - lex*. Official journal of the European Union. Sitio web: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/txt/?uri=celex:3200310126>