

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Validación de la técnica de PCR en tiempo real para la detección de la contaminación exógena de harina de pescado con especies acuáticas y terrestres”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Karolina Sabrina Martha De La Cruz Monroy

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

LIMA – PERÚ

2017

*Para mis padres, Martha y Raúl,
mi hermana Martha, mis abuelos
y Carlos, con mucho amor.*

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Veterinaria y Zootecnia (UPCH) y docentes que me formaron.

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) por el financiamiento del proyecto de acuerdo al contrato 113-PNICP-PIAP-2015.

A mis asesores, Dra. Marcela Mora y Dr. Armando Hung, por su apoyo y valiosas enseñanzas.

A mis padres, mi hermana y Carlos, por estar siempre a mi lado, dándome todo su apoyo, comprensión y amor.

A mis amigos incondicionales que siempre estuvieron ahí en todo momento.

ABSTRACT

Peru is the main producer and exporter of fishmeal worldwide, with anchovy (*Engraulis ringens*) being the only species allowed for its production according to Peruvian legal regulations. However, it can be altered due to contamination with other aquatic and/or terrestrial species, affecting its quality, and damaging animal health and nutrition. Nowadays, the development of an efficacious molecular method with high sensitivity and specificity to detect such contamination is required. The aim of this study is to validate a qPCR test to detect the exogenous contamination or adulteration of fishmeal with five aquatic species, peruvian weakfish (*Cynoscion analis*), bonito (*Sarda chiliensis*), pacific chub mackerel (*Scomber japonicus*), horse mackerel (*Trachurus picturatus*) and hake (*Merluccius gayi*); and two terrestrial species, chicken (*Gallus gallus domesticus*) and bovine (*Bos taurus*). For this purpose, meals of all species were prepared in the Laboratory of Molecular Biology (FAVEZ – UPCH), and individual contamination of anchovy meal was carried out with each species at 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% and 0.01%; and one multiple contamination with 0.1% of all species. The qPCR protocols established by Huamanca (2017) were used, modifying the primer concentration in some cases. The minimum concentration detected of Peruvian weakfish, bonito, pacific chub mackerel, horse mackerel, hake and chicken was 0.01%; meanwhile, for bovine it was 0.05%. The application of this technique serves as a tool for the rapid detection of fishmeal contamination, and it could be used by the authorities for monitoring and control. In addition, it serves as a certification system for commercial fishmeal produced by companies in the country.

Key words: fishmeal, qPCR, contamination, adulteration

RESUMEN

El Perú es el principal productor y exportador de harina de pescado a nivel mundial, siendo la anchoveta (*Engraulis ringens*) la única especie permitida para su producción de acuerdo a la normativa legal peruana. Sin embargo, esta puede alterarse debido a la contaminación con otras especies acuáticas y terrestres, afectando su calidad, perjudicando la salud y nutrición de los animales. En la actualidad existe la necesidad de desarrollar un método molecular rápido, de alta sensibilidad y especificidad, para detectar dicha contaminación. Por lo que el presente estudio tiene por objetivo validar la prueba de qPCR para detectar la contaminación exógena o adulteración de harina de pescado con cinco especies acuáticas, ayanque (*Cynoscion analis*), bonito (*Sarda chiliensis*), caballa (*Scomber japonicus*), jurel (*Trachurus picturatus*) y merluza (*Merluccius gayi*); y dos especies terrestres, ave (*Gallus gallus domesticus*) y bovino (*Bos taurus*). Para ello se elaboraron harinas de todas las especies en el Laboratorio de Biología Molecular (FAVEZ – UPCH); y se realizó un proceso de contaminación individual de la harina de anchoveta con cada especie mencionada al 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% y 0.01% y una contaminación múltiple con todas las especies al 0.1%. Se utilizaron los protocolos de qPCR establecidos por Huamancha (2017), modificando en algunos casos la concentración de primers. La concentración mínima detectada de ayanque, bonito, caballa, jurel, merluza y ave fue 0.01%; mientras que para bovino fue 0.05%. La aplicación de esta técnica sirve como una herramienta para la rápida detección de la contaminación de harinas, y podría utilizarse para el monitoreo y control por parte de las autoridades competentes, además de servir como un sistema de certificación para las harinas comerciales producidas por las empresas harineras del país.

Palabras clave: Harina de pescado, qPCR, contaminación, adulteración.

INTRODUCCIÓN

La harina de pescado es un producto obtenido a partir de la eliminación de la mayor parte del agua y aceite del pescado. Tiene un 40 a 72% de proteínas, dependiendo si se utilizó el pescado entero o sus desechos, y el tipo de secado (por aire caliente directo, indirecto, al vacío); conteniendo los nutrientes necesarios para la alimentación de aves, porcinos, bovinos, entre otros, siendo de mayor importancia en animales jóvenes como pollos de engorde de etapa inicial y cerdos recién destetados (FAO, 2002). Además, junto con el aceite de pescado, son la base para la producción de alimentos balanceados para la acuicultura (Auchterlonie, 2016).

De acuerdo al Decreto Supremo N° 015-2007-PRODUCE, Artículo 134°, Infracciones, numeral 81, procesar los recursos hidrobiológicos sardina, jurel y caballa para la elaboración de harina de pescado, así como descargar dichos recursos en los citados establecimientos industriales pesqueros, constituye una infracción administrativa en las actividades pesqueras y acuícolas. Es por ello que de acuerdo a esta norma legal, la única especie permitida para la producción de harina de pescado es la anchoveta.

En el Perú, se capturaron 4 millones de toneladas de anchoveta en el 2015, de los cuales el 95% se destinó a la producción de harina de pescado (Requejo, 2016). En el 2016 se capturaron 2.7 millones de toneladas y hasta mediados del 2017 se reportó la captura de 2.3 millones, estimando que se llegarán a los 4.7 millones en todo el año (Luna, 2017). Siendo el principal productor y exportador a nivel mundial con un 18% y 25% respectivamente (Pesquera Exalmar S.A.A, 2016).

En 1986 se reportó por primera vez en Reino Unido la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), una enfermedad infecciosa, neurológica, progresiva y fatal del ganado; producida por el consumo de alimentos de origen animal (harina de carne y huesos) contaminados con priones. También, existe una variante que afecta a los humanos llamada enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, producida por el consumo de tejidos bovinos infectados (Khan, 2007). Esto conllevó a que la Comisión Europea (CE) desarrolle medidas para reducir el riesgo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) para proteger la salud humana y animal. Es por ello que se desarrolló la regulación EC N°999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, en donde se dictaminan reglas para la prevención, control y erradicación de ciertas EETs. Una de las medidas más efectivas consistió en la prohibición total en la Unión Europea (UE) del uso de proteína animal procesada (PAP) en los alimentos para cualquier animal de granja destinado para consumo (EFSA, 2007).

En el 2001 se estableció la prohibición temporal en la UE (EC N°2000/766 y 2001/9) del uso de harina de pescado en el alimento de rumiantes, siendo la única fuente de PAPs autorizada para la alimentación de cerdos y aves. Sin embargo, en el 2003 dicha prohibición pasó a ser permanente. Esto fue debido a las dificultades que hay para detectar pequeñas cantidades de proteínas de rumiante en los alimentos que contienen harina de pescado (EFSA, 2007; Fumière *et al.*, 2009).

De acuerdo a la Regulación N° 152/2009 de la UE, el único método oficial validado para la detección de PAPs en los alimentos de animales o en sus ingredientes era la microscopía; cuya sensibilidad disminuye cuando hay una cantidad significativa de harina de pescado. Además, esta prueba no puede discriminar entre especies (EFSA, 2007; Fumière *et al.*, 2009). Dicha regulación fue enmendada por la Regulación N° 51/2013, indicando que una prueba de PCR en tiempo real fue validada para detectar la presencia de componentes de origen animal y puede ser utilizada como un método de control oficial, ya sea junto con o reemplazando el método microscópico (dependiendo del tipo de alimento).

Existen otras técnicas que nos permiten detectar la presencia de PAPs, no obstante poseen ciertas desventajas. Por ejemplo, la técnica de ELISA tienen una sensibilidad relacionada con el tratamiento térmico de la harina de carne y huesos; NIRS (Espectroscopia del infrarrojo cercano) carece de especificidad a nivel de especie; y pruebas comerciales como “ReVeal for Ruminant in MBM” (inmunocromatografía de flujo lateral), tienen una especificidad limitada a la detección de material de rumiante y son altamente dependientes del tejido (Fumière *et al.*, 2006).

Las técnicas moleculares basadas en ADN proveen una buena solución para la identificación de especies animales en alimentos, y tienen muchas ventajas sobre otras técnicas, como aquellas basadas en proteínas. Esto se debe a que la molécula de ADN es más estable, por lo que permite la identificación de especies en productos calentados y procesados; la estructura del ADN se conserva en todos los tejidos de un individuo; y permite una mayor discriminación de las especies estrechamente relacionadas. Dentro de las técnicas moleculares, la PCR tiene un alto nivel de especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión (FSSAI, 2015).

Debido a la necesidad de disponer de un método que sea capaz de identificar y caracterizar las especies utilizadas en la elaboración de harina de pescado en nuestro país, el presente trabajo tiene por objetivo validar la prueba de qPCR para la detección de la contaminación artificial de la harina de pescado (*Engraulis ringens*) con las especies de Ayanque (*Cynoscion analis*), Bonito (*Sarda chiliensis*), Caballa (*Scomber japonicus*), Jurel (*Trachurus picturatus*), Merluza (*Merluccius gayi*), ave (*Gallus gallus domesticus*) y bovino (*Bos taurus*). De esta manera, se podrá elaborar un método para el control, monitoreo y certificación de calidad de la harina de pescado, que incluya la autenticación genética del producto dentro de sus parámetros de calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (San Martín de Porres, Lima – Perú).

2. Tipo de estudio

Experimental

3. Muestras

Las muestras de anchoveta (*Engraulis ringens*), ayanque (*Cynoscion analis*), bonito (*Sarda chiliensis*), caballa (*Scomber japonicus*), jurel (*Trachurus picturatus*), merluza (*Merluccius gayi*), ave (*Gallus gallus domesticus*) y bovino (*Bos taurus*), utilizadas para la elaboración de las harinas, fueron obtenidas de mercados y terminales pesqueros de Lima y Chimbote.

4. Preparación de harinas

Se utilizaron parámetros similares a los empleados en la elaboración de harinas comerciales (FAO, 1986). Los tejidos musculares de cada especie se sometieron a autoclavado a 100°C por 20 minutos, se eliminó el líquido y aceite, se secaron en un horno a 95°C y se trituro hasta obtener la harina. Se verificó la pureza de cada harina mediante PCR descartando la contaminación cruzada.

5. Extracción de ADN

Se utilizó el DNeasy Mericon Food kit (QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo de extracción de pequeños fragmentos (200mg). Inicialmente se utilizaron 600 mg de cada muestra (3 tubos con 200 mg cada uno) para obtener la cantidad necesaria de sobrenadante (700 μ l). Se realizaron dos modificaciones del protocolo de QIAGEN: centrifugación a 2,500 x g por 6 minutos y 14,000 x g por 20 minutos. El ADN fue almacenado a -20°C.

Para determinar la concentración y pureza del ADN se utilizó el espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific, EEUU).

6. PCR en tiempo real

Se ajustó el protocolo del PCR en tiempo real establecido por Huamancha (2017), utilizando el termociclador LightCycler 96 (Roche, Suiza), el master mix Absolute QPCR Mix SYBR Green (Thermo Scientific, Estados Unidos); y primers de *Engraulis ringens* (Chairi y Rebordinos, 2014), *Scomber* (Infante *et al.*, 2006), *Trachurus picturatus* (Apostolidis *et al.*, 2008), *Sarda sarda* (Rehbein *et al.*, 1995), *Cynoscion analis*, *Merluccius gayi* (diseñados en el Laboratorio de Biología Molecular FAVEZ-UPCH), *Bos taurus* y *Gallus gallus domesticus* (Safdar y Junejo, 2015) (Cuadro 1). Con un volumen final de 12.5 μ l, 2.5 μ l de ADN, y primers a una concentración de 0.5 μ M (anchoveta, ayanque, bonito y merluza), 0.3 μ M (caballa, jurel y bovino) y 0.08 μ M (ave).

El protocolo de PCR utilizado para las especies acuáticas fue: 94°C por 5min; 40 ciclos de 94°C por 45s, 58°C por 45s y 72°C por 1min; 72°C por 10min; 95°C por 10s; 65°C por 1min; y 97°C por 1s. Para ave y bovino el protocolo fue: 95°C por 15min; 40 ciclos de 95°C por 30s, 60°C por 30s y 72°C por 30s; 95°C por 1min 58s; 72°C por 5s; y 95°C por 1min.

Los resultados obtenidos fueron confirmados mediante electroforesis, con un gel de agarosa al 2%, utilizando un voltaje de 70V, amperaje de 170mA por 60 minutos.

7. Validación del qPCR

Se contaminó la harina de anchoveta con 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% y 0.01% de harina de ayanque, bonito, caballa, jurel, merluza, ave y bovino individualmente para determinar el límite de detección por especie y una contaminación múltiple utilizando 0.1% de harina de cada especie. Luego, se realizaron 10 repeticiones de extracciones del límite de detección para cada especie y 3 repeticiones de las extracciones de la harina contaminada con múltiples especies al 0.1%. Las contaminaciones tuvieron un peso final de 30g.

La sensibilidad se determinó mediante 10 repeticiones con presencia del target y 10 repeticiones con ausencia del target. La especificidad fue obtenida de los resultados de Huamancha (2017).

8. Análisis estadístico

Se utilizó el software del LightCycler® 96 versión 1.1.0.1320 y el software estadístico Minitab versión 17 para el análisis de los datos.

CUADRO 1. Primers, tamaño de banda y temperatura de melting (Tm) para las especies acuáticas y terrestres.

Especie	Secuencia de primers	Tamaño de banda (bp)	Tm (°C)
Anchoveta	F: 5'TGAAAAAGGGAATGGGGTTT-3' R: 5'-CGGTCCTTTTAGGGTTAGGG-3'	250	84.54 ± 0.13
Ayanque	F: 5'- CCTCTGCCCCGATGACTTAAT-3' R: 5'-CACTTATGTCCGCCTAGACTTAG-3'	106	79.89 ± 0.20
Bonito	F: 5'-GTC GAA TGA ATC TGA GGA GGC TT-3' R: 5'-ATT GGG TTG TTT GAC CCT GTTTC-3'	148	80.98 ± 0.54
Caballa	F: 5'-GCAAAATTGGCACAGCCCAGAACGTCA-3' R: 5'-CGGTGTGTACGCACTTCAGAGCCGATT-3'	188	82.82 ± 0.53
Jurel	F: 5'-CTGAAACACCGGAGTCGTT-3' R: 5'-CCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'	90	78.78 ± 0.38
Merluza	F: 5'- CCT CAC TTC CTT TCT CCA AAG A-3' R: 5'- GCA GGG ATG CCA GGA ATA A -3'	133	80.13 ± 0.13
Ave	F: 5'-GGGCTATTGAGCTCACTGTT-3' R: 5'-TGAGAACTACGAGCACAAAC-3'	183	84.98 ± 0.44
Bovino	F: 5'- CAAGAACACTAATGACTAACATTCGAAAG-3' R: 5'-AAATGTTTGTGATGGGGCTGGA-3'	93	78.19 ± 0.41

Fuente: Huamancha L. 2017.

RESULTADOS

1. Preparación de harinas

El método utilizado fue el adecuado, evitándose la contaminación cruzada de las harinas, al prepararlas en diferentes días, limpiando las superficies con alcohol 80% y lejía 2%, utilizando materiales esterilizados para cada especie y almacenándolas en cajas separadas. De esta forma se aseguró el uso de harinas puras para las contaminaciones, ya que las harinas comerciales podrían no ser las adecuadas.

2. Extracción de ADN

El método de extracción fue preciso para este tipo de alimentos procesados a altas temperaturas, pudiéndose obtener ADN de cada harina, con concentraciones entre 5.3 – 127 ng/μl de ADN y purezas entre 1.78 – 2.58 A260/280 para las especies acuáticas; y concentraciones entre 3.1 – 30.4 ng/μl y purezas entre 1.92 – 2.12 para las especies terrestres (Cuadro 2).

3. PCR en tiempo real

Se evaluaron los valores de ciclo umbral (Cq), temperatura de melting (Tm°C) y concentración (copias ADN/μl) de cada especie (Cuadro 3) para verificar la pureza de las harinas preparadas. No se evidenció contaminación cruzada de las harinas.

4. Validación del qPCR

4.1 Ayanque

La concentración adecuada de primers fue 0.5 μ M; obteniendo un límite de detección de 0.01%, 0.00523 copias ADN μ l⁻¹, Cq 36.02 \pm 2.00 y Tm 80.05 \pm 0.21 $^{\circ}$ C (Cuadro 4, Figura 1a y 2a).

4.2 Bonito

La concentración adecuada de primers fue 0.5 μ M; obteniendo un límite de detección de 0.01%, 0.00020 copias ADN μ l⁻¹, Cq 37.14 \pm 0.84 y Tm 80.67 \pm 0.16 $^{\circ}$ C (Cuadro 4, Figura 1b y 2b).

4.3 Caballa

Se modificó el protocolo del master mix, aumentando la concentración de primers a 0.5 μ M, obteniendo un límite de detección de 0.01%, 0.00991 copias ADN μ l⁻¹, Cq 28.56 \pm 0.83 y Tm 82.18 \pm 0.11 $^{\circ}$ C (Cuadro 4, Figura 1c y 2c). Se observó curvas de amplificación para los controles negativos (agua y blanco de extracción) debido a la formación de dímeros (Figura 5c y d).

4.4 Jurel

Se modificó el protocolo del master mix aumentando la concentración de primers a 0.8 μ M y se trabajó con la primera dilución 1:10 de cada extracción, obteniendo un límite de detección de 0.01%, 0.01930 copias ADN μ l⁻¹, Cq 36.43 \pm 1.57 y Tm 79.25 \pm 0.22 $^{\circ}$ C (Cuadro 4, Figura 1d y 2d).

4.5 Merluza

La concentración adecuada de primers fue 0.5 μ M; obteniendo un límite de detección de 0.01%, 0.06158 copias ADN μ l⁻¹, Cq 27.78 \pm 1.64 y Tm 79.29 \pm 0.12 $^{\circ}$ C (Cuadro 4, Figura 1e y 2e).

4.6 Ave

Se modificó el protocolo de master mix aumentando la concentración de primers a 0.6 μ M y se trabajó con la primera dilución 1:10 de cada extracción para eliminar inhibidores observados en la fluorescencia, obteniendo una mejora en la lectura de las curvas, pudiendo llegar a un límite de

detección de 0.01%, 0.00071 copias ADN μl^{-1} , C_q 28.80 ± 1.55 y T_m $84.88 \pm 0.22^\circ\text{C}$ (Cuadro 4, Figura 1f y 2f). Se observó curvas de amplificación para los controles negativos (agua y blanco de extracción) debido a la formación de dímeros (Figura 5f y g).

4.7 Bovino

Se trabajó con la primera dilución 1:10 de la extracción para eliminar inhibidores observados en la fluorescencia y primers a $0.5\mu\text{M}$; obteniendo un límite de detección de 0.05%, 0.00844 copias ADN μl^{-1} , C_q 26.25 ± 0.88 y T_m $78.08 \pm 0.14^\circ\text{C}$ (Cuadro 4, Figura 1g y 2g).

4.8 Contaminación múltiple

En el caso de la contaminación múltiple al 0.1%, se obtuvieron amplificaciones para todas las especies en las tres extracciones (Cuadro 5, Figura 3 y 4).

Se observó una curva de amplificación para el control negativo (agua) de ave, debido a la formación de dímeros (Figura 5h).

4.9 Sensibilidad y especificidad

Las 10 repeticiones con presencia del ADN target para cada especie resultaron positivas y las 10 repeticiones con ausencia del target resultaron negativas, siendo el ensayo 100% sensible y específico.

CUADRO 2. Resultados de concentración y pureza. Extracciones de ADN de harinas puras.

Harina	Concentración (ng/μl)	Factor	A260 (10 mm)	A280 (10 mm)	A3rd (10 mm)	A260/A280*
Anchoveta	127,0	50	2,541	1,361	0,012	1,87
	60,2	50	1,204	0,64	0,011	1,88
Ayanque	7,0	50	0,14	0,066	0,017	2,14
	5,5	50	0,11	0,053	0,01	2,06
Bonito	17,9	50	0,358	0,161	0,022	2,22
	15,1	50	0,302	0,134	0,003	2,26
Caballa	7,0	50	0,141	0,061	0,001	2,29
	6,4	50	0,128	0,05	0	2,58
Jurel	12,1	50	0,241	0,136	0,051	1,78
	10,4	50	0,209	0,089	0,01	2,34
Merluza	6,4	50	0,128	0,06	0,012	2,12
	5,3	50	0,106	0,048	0,002	2,2
Ave	3,1	50	0,062	0,032	0,004	1,92
	4,7	50	0,094	0,044	0,01	2,12
Bovino	30,4	50	0,609	0,312	0,06	1,95
	26,2	50	0,525	0,27	0,041	1,95

*Valor óptimo de pureza: A260/A280 ~1.8 (Thermo Fisher Scientific, 2010)

CUADRO 3. Resultados de qPCR. Valores de Cq y Tm promedios con desviación estándar de la harina de anchoveta, ayanque, bonito, caballa, jurel, merluza, ave y bovino.

Harina	Cq	Tm (°C)
Anchoveta	16.44 ± 2.02	84.17 ± 0.74
Ayanque	26.86 ± 1.02	81.13 ± 0.52
Bonito	24.74 ± 1.10	81.48 ± 0.45
Caballa	17.45 ± 0.88	83.23 ± 0.71
Jurel	26.05 ± 1.81	79.84 ± 0.38
Merluza	21.38 ± 1.71	80.59 ± 0.27
Ave	13.85 ± 2.57	85.71 ± 0.21
Bovino	14.21 ± 0.52	78.94 ± 0.46

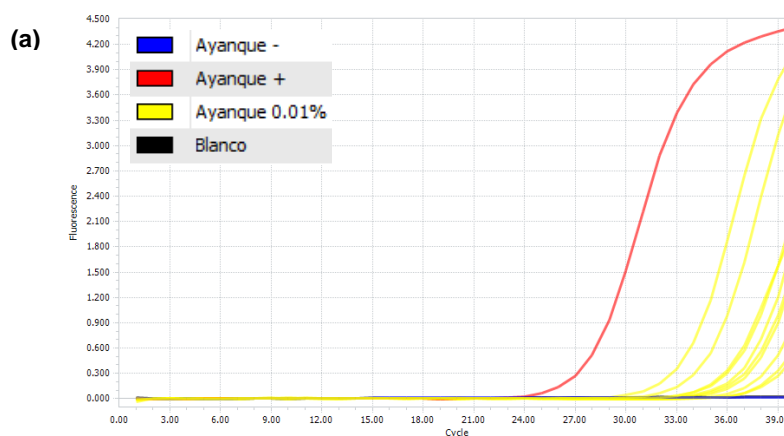
CUADRO 4. Resultados de qPCR del límite de detección de cada especie. Valores de Cq, Tm promedios con desviación estándar y concentración.

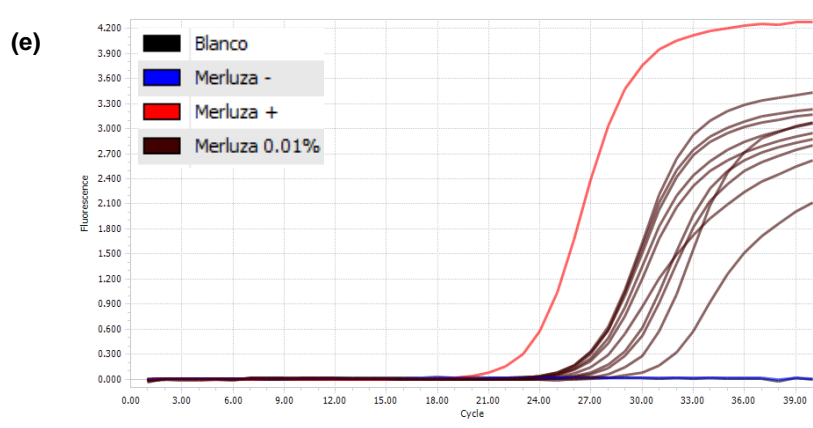
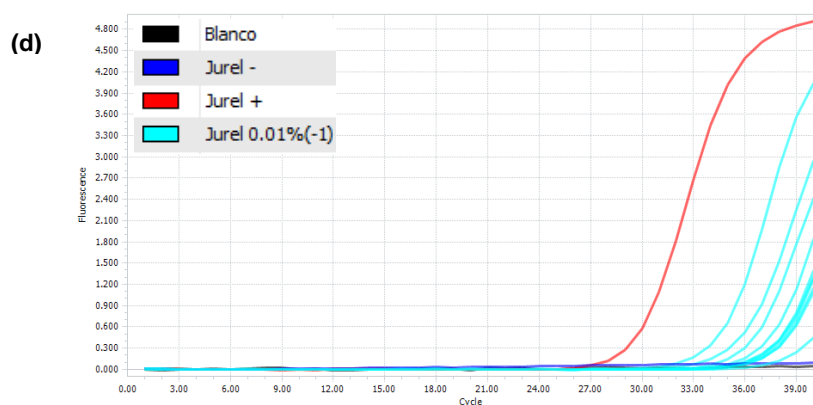
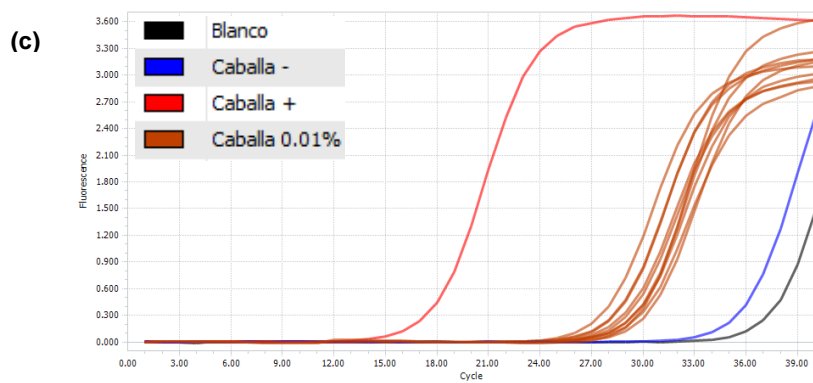
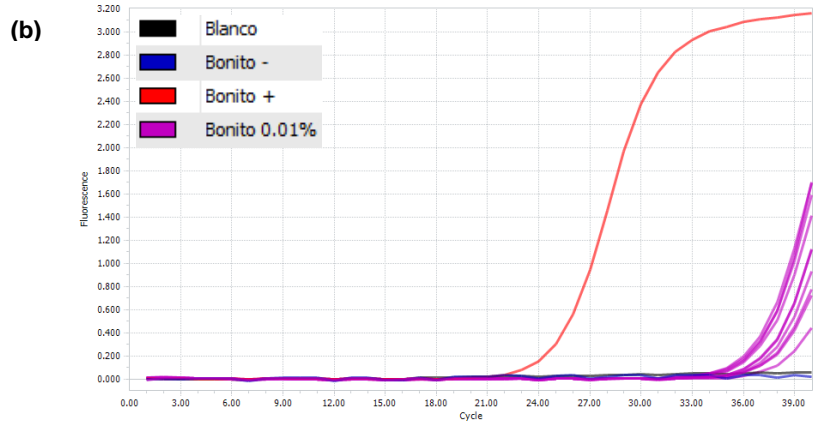
Contaminación	Límite de detección (%)	Cq	Concentración (copias ADN μl^{-1})	Tm ($^{\circ}\text{C}$)
Ayanque	0.01	36.02 \pm 2.00	0.00523	80.05 \pm 0.21
Bonito	0.01	37.14 \pm 0.84	0.00020	80.67 \pm 0.16
Caballa	0.01	28.56 \pm 0.83	0.00991	82.18 \pm 0.11
Jurel	0.01	36.43 \pm 1.57	0.01930	79.25 \pm 0.22
Merluza	0.01	27.78 \pm 1.64	0.06158	79.29 \pm 0.12
Ave	0.01	28.80 \pm 1.55	0.00071	84.88 \pm 0.22
Bovino	0.05	26.25 \pm 0.88	0.00844	78.08 \pm 0.14

CUADRO 5. Resultados de qPCR de la contaminación múltiple al 0.1%. Valores de Cq, Tm promedios con desviación estándar y concentración.

Contaminación 0.1%	Cq	Concentración (copias ADN μl^{-1})	Tm ($^{\circ}\text{C}$)
Ayanque	30.17 \pm 0.83	0.30112	79.76 \pm 0.08
Bonito	30.87 \pm 1.18	0.01456	82.87 \pm 0.21
Caballa	25.15 \pm 3.09	0.09801	82.14 \pm 0.07
Jurel	31.56 \pm 1.32	0.57497	79.55 \pm 0.18
Merluza	24.08 \pm 0.87	0.74360	79.70 \pm 0.04
Ave	23.62 \pm 0.58	0.01967	84.64 \pm 0.09
Bovino	26.02 \pm 2.11	0.00990	78.40 \pm 0.02

FIGURA 1. Límite de detección. Harina de anchoveta contaminada al 0.01% con Ayanque (a), bonito (b), caballa (c), jurel (d), merluza (e), ave (f) y al 0.05% con bovino (g).





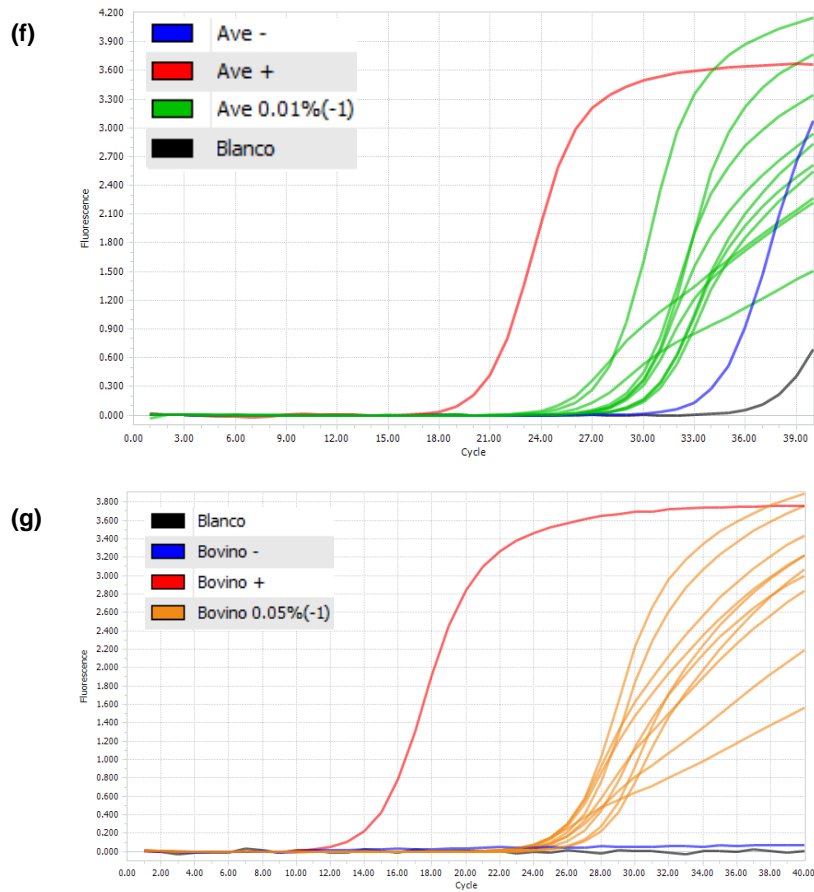
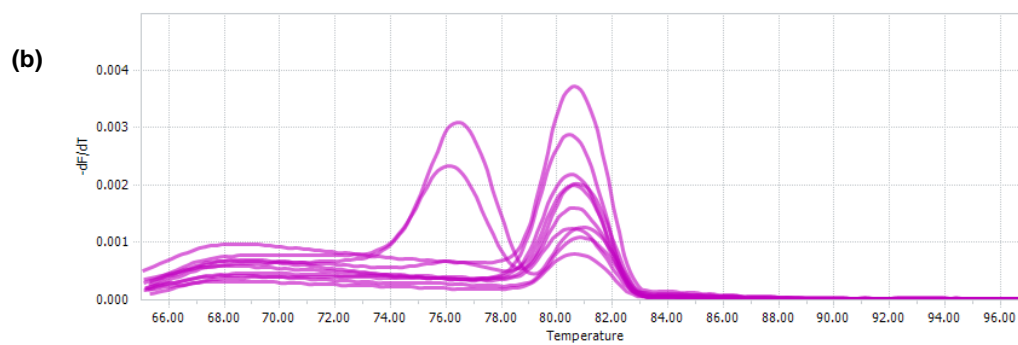
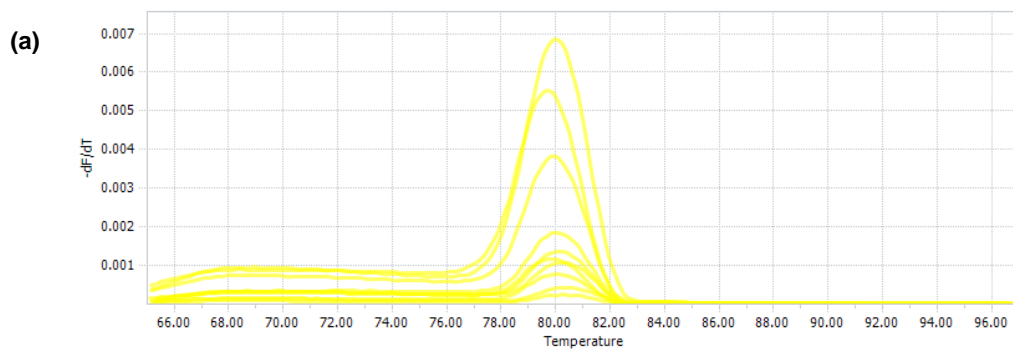
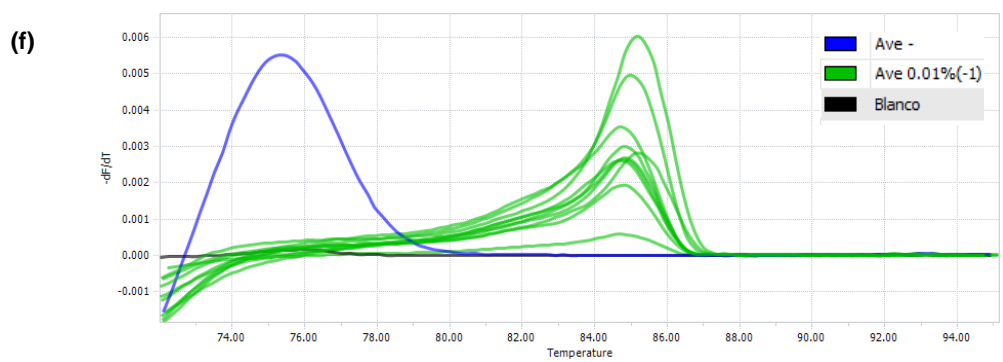
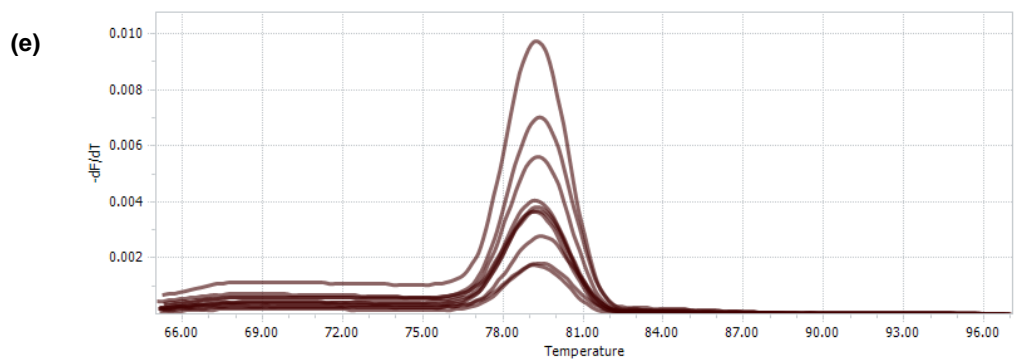
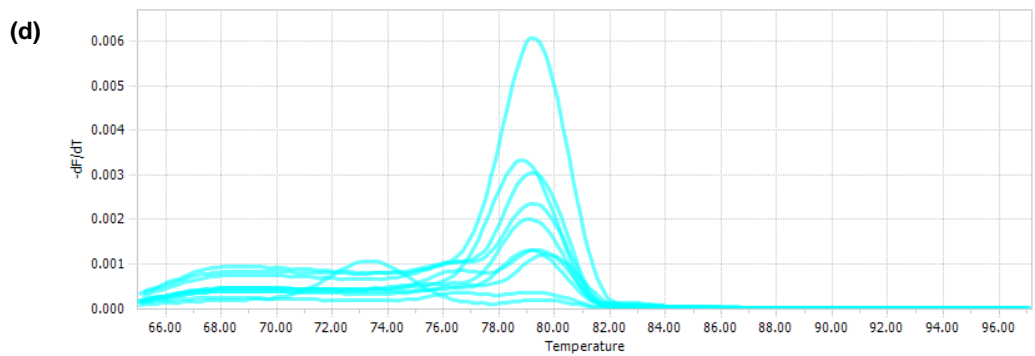
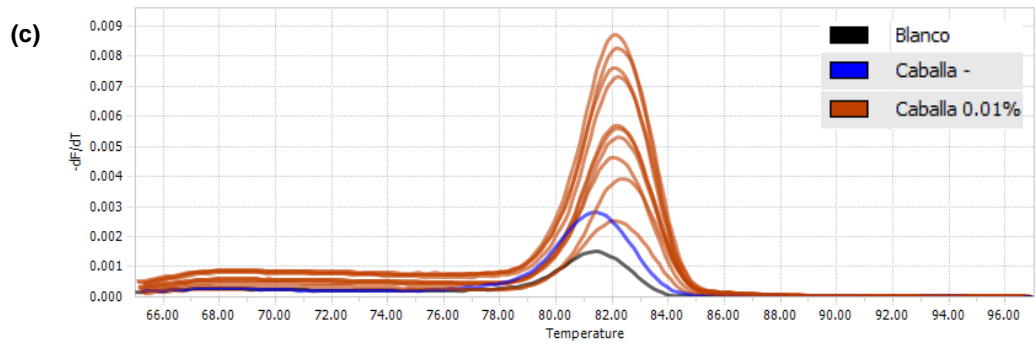


FIGURA 2. Picos de Melting de harina de anchoveta contaminada al 0.01% con Ayanque (a), bonito (b), caballa (c), jurel (d), merluza (e), ave (f) y al 0.05% con bovino (g).





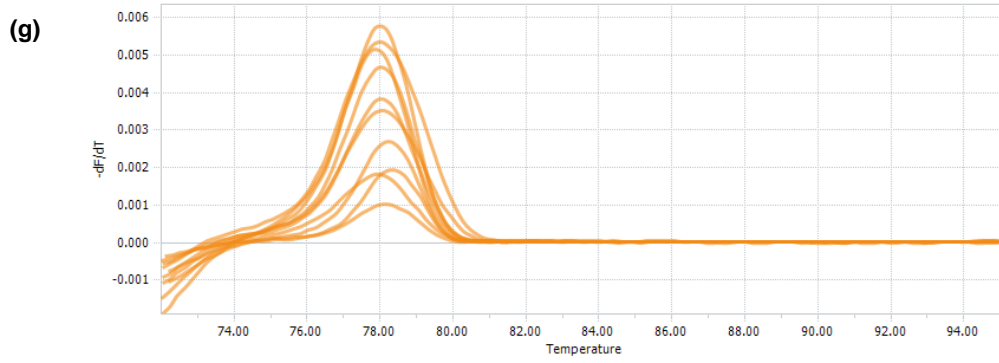
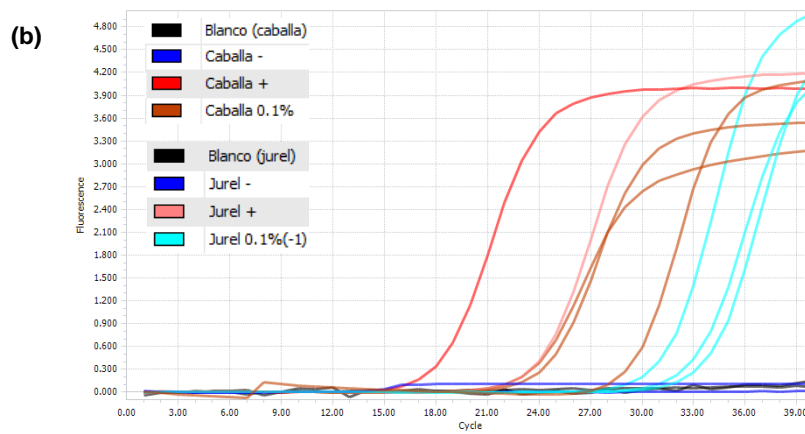
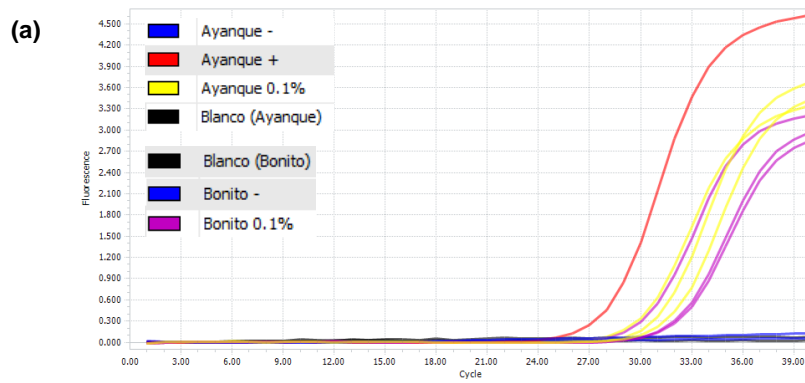


FIGURA 3. Contaminación múltiple al 0.1% de harina de anchoveta. Ayanque y bonito (a), caballa y jurel (b), merluza (c), ave y bovino (d).



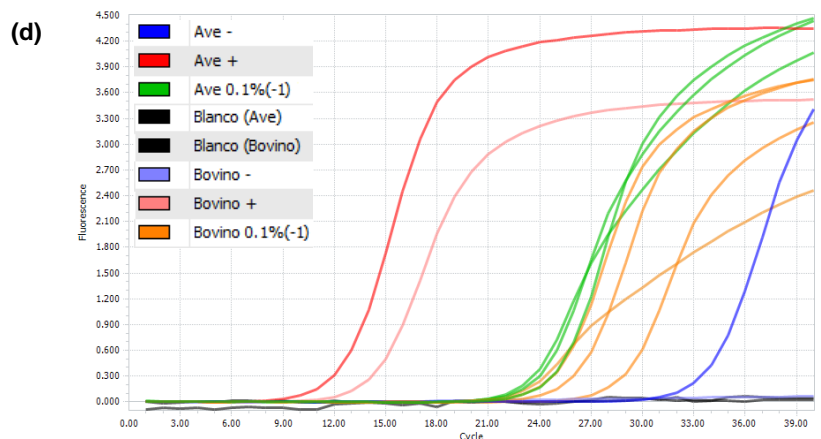
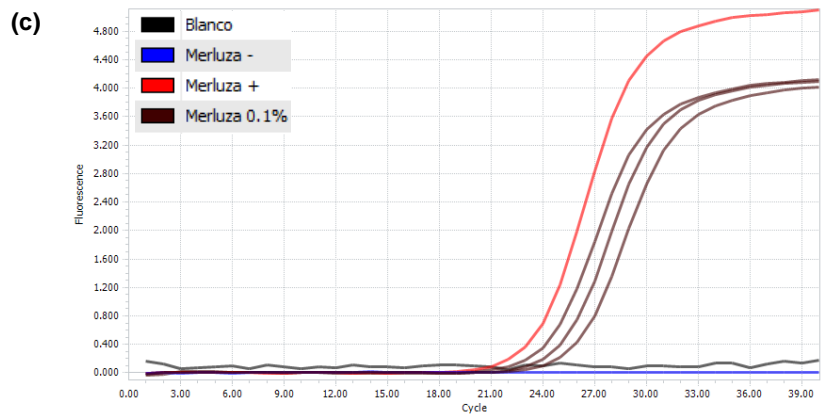
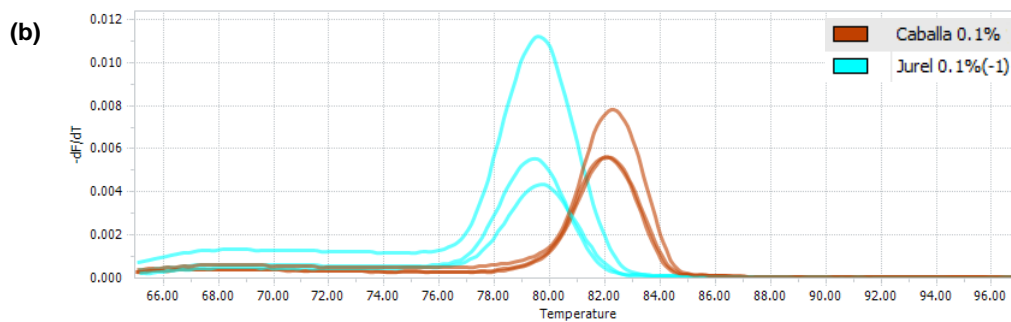
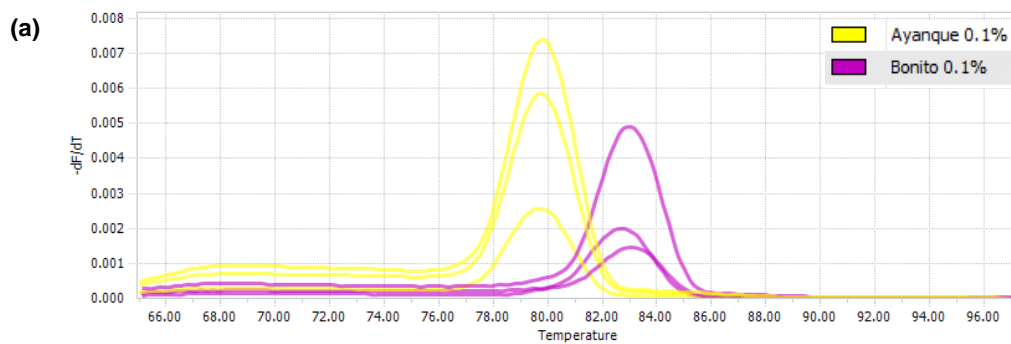


FIGURA 4. Picos de Melting de contaminación múltiple al 0.1% de harina de anchoveta. Ayanque y bonito (a), caballa y jurel (b), merluza (c), ave y bovino (d).



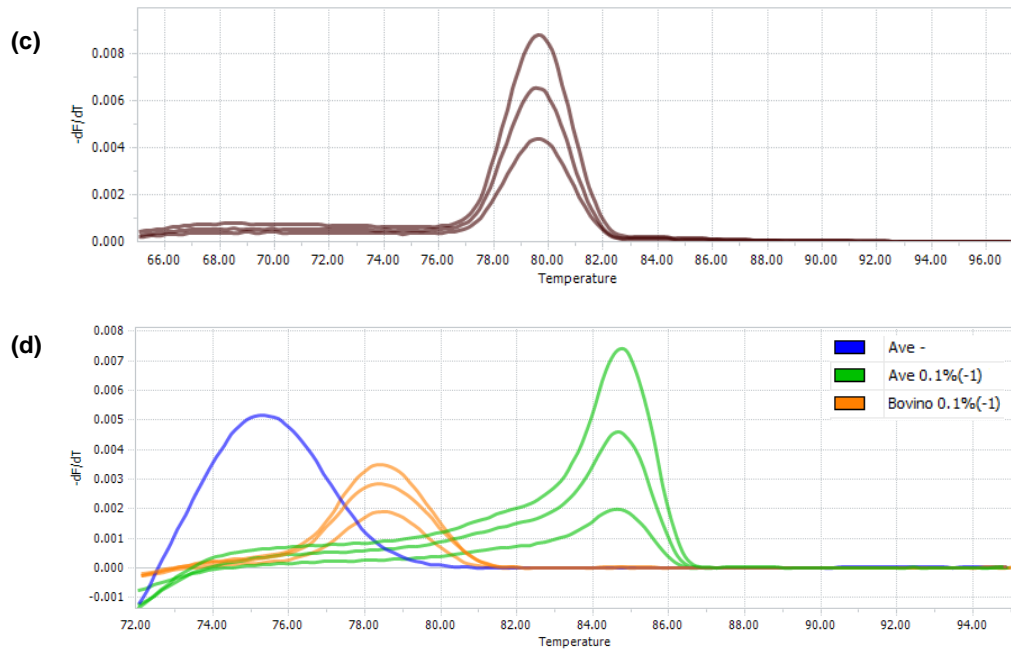
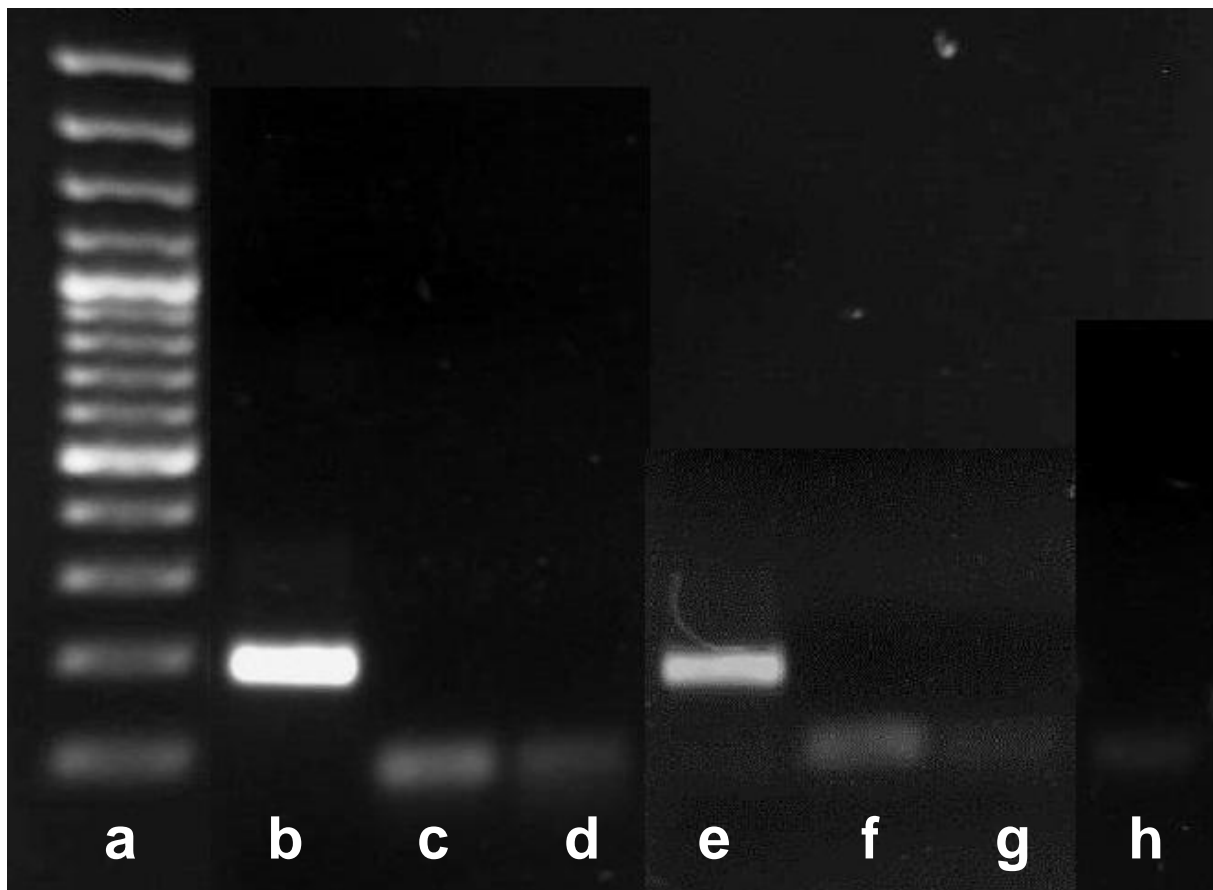


FIGURA 5. Electroforesis en gel de agarosa 2% de los controles negativos de la contaminación al 0.01% de caballa y ave; y la contaminación múltiple al 0.1% de ave. a) Ladder 100 bp, b) caballa + (188 bp), c) agua, d) blanco, e) ave + (183 bp), f y h) agua, y g) blanco.



DISCUSIÓN

En este estudio se comprobó que los protocolos de PCR en tiempo real desarrollados por Huamancha (2017) son capaces de detectar el ADN extraído de las harinas preparadas con especies acuáticas y terrestres. Sin embargo, se realizaron modificaciones en algunos protocolos, con el fin de lograr una mejor detección del ADN en las harinas contaminadas obteniendo un límite de detección de 0.05% para bovino y 0.01% para las demás especies.

La PCR en tiempo real es una prueba de gran utilidad, que a diferencia de la PCR convencional, no hay la necesidad de manipular el producto para un proceso posterior, por lo tanto, disminuye el tiempo requerido para obtener resultados y reduce ambigüedades producidas por la interpretación de las imágenes obtenidas por la electroforesis de un gel de agarosa. Además, los picos de melting permiten discriminar productos inespecíficos (Myers, 2005).

SYBR Green es un fluorocromo utilizado en el PCR de tiempo real, el cual se intercala en el ADN de doble cadena (dsADN), emitiendo una fluorescencia que permite monitorear la amplificación de cualquier secuencia de dsADN. Sin embargo, la principal desventaja es que puede detectar dímeros y otros amplicones no específicos, además del target, generando señales de falsos positivos (Loftis y Reeves, 2012). Gudnason *et al.* (2007) compararon múltiples fluorescentes para PCR en tiempo real, observando que SYBR Green I dio concentraciones de dímeros tres veces mayor, en bajas concentraciones del template, en comparación con SYTO-82. Además de electroforesis, el análisis de las curvas de melting pueden ayudar a determinar si la señal proviene del target o de dímeros (Rasmussen, 2012).

Es por ello que se pudo observar en los casos de caballa y ave, curvas de amplificación para controles negativos y blancos de extracción, producido por la unión del SYBR a los dímeros formados. Mediante electroforesis se pudo comprobar que los controles negativos no estaban contaminados (Figura 5). Además, las temperaturas de melting de los controles negativos fueron más bajas que la del target, lo cual se suele ver en casos de dímeros. En el caso de ave, los controles negativos tuvieron una T_m de 75.32°C, 75.85°C y 75.30°C, en comparación con el promedio de 85.71 ± 0.21°C de los controles positivos. Mientras que para caballa, el control negativo y el blanco tuvieron una T_m de 81.38°C y 81.34°C respectivamente, y el promedio de los controles positivos fue 83.23 ± 0.71°C. En otros estudios, en los cuales se detectaron diversas especies de peces (*Scomber scombrus*, *Trachurus trachurus*, *Merluccius spp.* y *Engraulis encrasicolus*) utilizando SYBR Green, no se detectó la presencia de dímeros (Prado *et al.*, 2012; 2013).

La harina es un alimento altamente procesado, sometido a elevadas temperaturas, presión y molienda, lo cual produce la fragmentación y degradación del ADN. De acuerdo a un estudio realizado por Fumiere *et al.* (2006), al evaluar harinas de carne y hueso (50% bovino y 50% porcino) procesadas a diferentes temperaturas, utilizando un protocolo para detectar ADN de bovino, determinaron que el punto de inicio de la amplificación depende del tratamiento térmico. Con un tratamiento térmico en el autoclave de 125°C, 130°C, 135°C, 138°C y 141°C (por 20 minutos), se obtuvieron valores de C_q de 29.6, 30.8, 34.3, 36.1 y 38.2 respectivamente. También, evaluaron una harina australiana (100% bovino) secada con más de 100°C por 30 min y una harina americana (100% bovino) secada con 132°C por 15 minutos, las cuales tuvieron un valor de C_q de 18.5 y 19.3 respectivamente. En el caso del presente estudio, se obtuvieron valores de C_q menores, entre 12.96 y 29.64, para las harinas puras debido a que las harinas fueron procesadas con menores temperaturas (100°C para la cocción y 95°C para el secado). A pesar de que se utilizó las mismas temperaturas para todas las harinas, la variación entre los valores de C_q puede deberse a que el tiempo de secado varió entre cada harina, por el tamaño de la carne o por su contenido de aceite y agua, lo cual pudo producir una mayor o menor degradación del ADN.

Además, el tamaño de banda es importante en estos casos ya que se debe considerar el grado de degradación del ADN, siendo necesario utilizar un amplicon de corto tamaño. En el estudio de Fumiere *et al.* (2006), esto fue comprobado al probar amplicones de diferentes longitudes, demostrando que los fragmentos mayores a 174 bp no pudieron ser detectados en las cinco harinas evaluadas. Mientras que en el presente estudio se utilizaron amplicones cortos, entre 90 y 188bp para las especies contaminantes, y 250bp para anchoveta, logrando una exitosa amplificación en todos los casos. Por lo tanto, el uso del DNeasy mericon Food Kit en el presente estudio es el adecuado, al ser capaz de recuperar fragmentos cortos de ADN (hasta 100 bp), utilizando CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) y proteinasa K. De esta forma, ADN altamente fragmentado puede ser aislado eficientemente. Además, de acuerdo al fabricante, es un kit que minimiza la cantidad de inhibidores de PCR en la muestra (QIAGEN, 2014).

Los inhibidores de PCR pueden reducir la sensibilidad y eficiencia de amplificación del PCR de diferentes maneras: inactivando la ADN polimerasa, degradando o capturando los ácidos nucleicos, interfiriendo en la lisis celular y degradando la secuencia deseada en la muestra. Estos se pueden encontrar dentro de la muestra, como las grasas, glucógeno, polisacáridos colágeno, melanina, mioglobina, minerales y enzimas; o pueden ser introducidos durante su procesamiento. Una forma de sobrellevar la inhibición del PCR es diluyendo la extracción de ADN de la muestra, para disminuir la cantidad de inhibidores (Klančnik *et al.*, 2012; Sovová *et al.*, 2017).

Es posible que debido a la presencia de inhibidores, no se haya logrado una buena lectura en los resultados de las contaminaciones de ave, bovino y jurel; por lo que las extracciones debieron ser diluidas para poder obtener una mejora en la detección del ADN. En un estudio realizado por Sovová *et al.* (2017), al utilizar un protocolo con CTAB para extraer ADN de un plásmido sintético (utilizado como control de amplificación) de muestras de harina de cordero y harina de estómago de res, se produjo una inhibición del PCR; probablemente porque los inhibidores presentes en las muestras no fueron suficientemente removidos durante la extracción. Por lo que se recomienda realizar la dilución

de todas las muestras, con el fin de evitar una incorrecta lectura de los resultados o un posible falso negativo.

La calidad de la harina de pescado es cuestionada debido a su adulteración con otras especies, por lo cual se han desarrollado diferentes técnicas para detectar su autenticidad. Los protocolos validados por la Unión Europea para la detección de proteína animal procesada en alimentos y sus ingredientes, son la microscopía de luz y PCR en tiempo real, las cuales tienen un límite de detección de < 0.1% (p/p) (Regulación N°51/2013/EC). La microscopía se basa en la identificación de partículas de origen animal (fibras musculares, cartílago, huesos, pelo, sangre, plumas y escamas) (Regulación N°51/2013/EC); siendo capaz de distinguir entre animales terrestres y pescados por sus características óseas (van Raamsdonk *et al.*, 2007). Al depender de la interpretación del analista, se pueden obtener diferencias en la sensibilidad, especificidad y precisión; y no es capaz de determinar la especie (Fumiere *et al.*, 2009). Además, su sensibilidad disminuye con la presencia de harina de pescado (Bachur, 2014), por ello, su utilización no garantiza ser el método ideal para la verificación de la autenticidad de las harinas comerciales. En cuanto al PCR, este fue validado para la detección de rumiantes, pudiéndose detectar 5 especies: bovino (*Bos taurus*), ovino (*Ovis aries*), caprino (*Capra hircus*), ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y corzo (*Capreolus capreolus*) (EURL-AP Team, 2017). A diferencia, el PCR del presente estudio pudo detectar cinco especies acuáticas y dos terrestres, con un límite de 0.01-0.05%.

Existen otras pruebas no validadas por la UE para la detección de proteína animal procesada, como la espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS) y el kits comerciales como “Reveal for ruminant in MBM” (inmunocromatografía de flujo lateral). El primero es una técnica que tiene la habilidad de identificar y cuantificar los ingredientes animales en mezclas de alimento, incluyendo la detección de harina de carne y hueso en harina de pescado. Sin embargo, su límite de detección es mayor al 1% y no puede identificar la especie (Fumiere *et al.*, 2009). Mientras que el kit puede diferenciar harina de carne y hueso de rumiante en harina de animales no rumiantes, solo con una sensibilidad del 2% (Neogen corporation, 2007). Por lo que, en comparación con las pruebas

mencionadas, el uso de la prueba de PCR demuestra ser de gran utilidad al ser más sensible y capaz de diferenciar las especies contaminantes.

En cuanto a la detección de harina de bovino y ave mediante PCR, se han realizado diversos estudios. Bellagamba *et al.* (2003), desarrollaron un protocolo de PCR convencional para detectar la adulteración de la harina de pescado con bovino, pollo, ovino, caprino y porcino. Realizando la esterilización de las harinas con una temperatura de 130°C por 40 minutos a 200 kPa; y la harina de pescado fue adulterada con 1, 0.5%, 0.25% y 0.125%. Obteniendo un límite de detección de 0.125% para ave y bovino. Al no realizarse una contaminación menor a 0.125% no se podría determinar si su protocolo sería capaz de obtener un límite de detección de 0.01-0.05% como el del presente estudio.

Por otro lado, Krcmar y Rencova (2005), elaboraron un protocolo de PCR en tiempo real, utilizando sondas TaqMan para detectar ADN de harinas de carne y hueso de bovino, pollo, ovino y porcino, en harina de pescado y piensos. Las harinas de carne y hueso fueron procesadas a una temperatura de 133°C, 300kPa por 30min, realizaron contaminaciones al 5, 1, 0.1 y 0.01% (p/p). El límite de detección fue de 0.01%, lo cual coincide con el resultado obtenido para ave en el presente estudio.

En cuanto a la detección de harina de pescado por medio de un protocolo de PCR, hay estudios diseñados para detectar su presencia en alimentos. Martín de la Torre *et al.* (2008), desarrolló una técnica de PCR en tiempo real, utilizando SYBR Green, para detectar la presencia de harina de pescado en piensos. Las mezclas experimentales fueron realizadas con tejido muscular de pescado en avena, con niveles de contaminación de 25, 10, 5, 1 y 0.1%, teniendo mezclas crudas y mezclas esterilizadas (121°C x 20min); pudiendo detectar un 0.1% de ADN de pescado. Se utilizó un fragmento del gen mitocondrial ARNr 12S a partir del ADN de todos los pescados. Algunas de las especies acuáticas que pudieron detectar, fueron *Sarda sarda* (bonito), *Scomber scombrus* (caballa), *Trachurus trachurus* (jurel), *Merluccius merluccius* (merluza europea) y *Engraulis encrasicolus* (anchoa europea). En el caso de Nomura *et al.* (2006), desarrollaron un protocolo de PCR para la

detección de harina de pescado en alimento de rumiante, utilizando primers basados en una secuencia del ADN mitocondrial del atún de aleta amarilla. Sin embargo, estos primers también fueron capaces de detectar ADN de diversas carnes de pescado, como caballa, anchoveta japonesa y jurel japonés. Se utilizaron 3 harinas de pescado comercial de Japón (caballa con parpada del pacífico; atún listado y atún; y sardina) para realizar la contaminación, detectando hasta un 0.01 - 0.001% de harina en alimento de rumiante. A diferencia del presente estudio, los protocolos mencionados no son capaces de determinar la especie en la harina de pescado, por lo que no serían de gran utilidad ya que no se podría diferenciar la anchoveta de las demás especies acuáticas.

Finalmente, en el presente estudio se demuestra que los protocolos de PCR validados para la detección de ADN de especies contaminantes de la harina de anchoveta tuvieron resultados satisfactorios, convirtiéndola en una herramienta de gran utilidad para la rápida detección de la contaminación de harina de pescado. Por lo que, su aplicación y utilización por parte de empresas harineras y autoridades competentes, como un sistema de certificación para las harinas comerciales, monitoreo y control; ayudaría a garantizar harinas de buena calidad.

CONCLUSIONES

- El método de extracción de ADN utilizado fue adecuado para este tipo de alimento procesado con altas temperaturas, logrando obtener ADN de buena calidad de cada harina.
- El protocolo de PCR en tiempo real utilizado para la detección de cada especie logró amplificar las muestras de ADN obtenidas de las harinas preparadas, con una sensibilidad y especificidad del 100%.
- Se obtuvo un límite de detección de 0.05% para bovino (0.0000073 copias/ μ l de ADN) y 0.01% para ayanque (0.00523 copias/ μ l de ADN), bonito (0.00020 copias/ μ l de ADN), caballa (0.00991 copias/ μ l de ADN), jurel (0.01930 copias/ μ l de ADN), merluza (0.00018 copias/ μ l de ADN) y ave (0.0000053 copias/ μ l de ADN); con la necesidad de utilizar la dilución de las extracciones de ADN de ave, bovino y jurel para reducir inhibidores. Por lo que se recomienda utilizar la primera dilución 1:10 de las muestras para el análisis.

LITERATURA CITADA

- Apostolidis A, Georgiadis A, Karaïskou N, Sandaltzopoulos R. 2008. 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. *Hydrobiologia*: 614(1): 401-404.
- Auchterlonie N. Julio de 2016. IFFO responde al artículo sobre la sustitución completa del aceite de pescado con la microalga marina *Schizochytrium*. IFFO Update. Ed. 828, 5-6.
- Bachur S. 2014. Revisión de los principales métodos de detección e identificación de proteínas animales procesadas en alimentos balanceados. *SNS*: 5-6: 15-27.
- Bellagamba F, Valfrè F, Panseri S, Moretti VM. 2003. Polymerase chain reaction-based analysis to detect terrestrial animal protein in fish meal. *Journal of food protection*: 66(4): 682-685.
- Chairi H, Rebordinos L. 2014. A Rapid Method for Differentiating Four Species of the *Engraulidae* (Anchovy) Family. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*: 62(13): 2803-2808.
- Decreto Supremo N° 015-2007-PRODUCE. El Peruano, Lima, Perú, 4 de agosto de 2007.
- EFSA. 2007. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the European Parliament on the assessment of the health risks of feeding of ruminants with fishmeal in relation to the risk of TSE. *The EFSA Journal*: 443: 1-26.

- EURL-AP Team. 2017. EURL-AP Standard Operating Procedure - Detection of ruminant DNA in feed using real-time PCR. European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in feedingstuffs. Version 1.2.
- FAO. 1986. The production of fish meal and oil, FAO fisheries technical paper N°142. Rome: 63p.
- FAO. 2002. Inocuidad y comercio de la harina de pescado. Comité de pesca, Subcomité sobre comercio pesquero, octava reunión, Tema 4 del programa provisional. Bremen, Alemania.
- FSSAI. 2015. Manual of methods of analysis of foods: meat and meat products & fish and fish products. Ministry of health and family welfare, Government of India, New Delhi.
- Fumière O, Dubois M, Baeten V, von Holst C, Berben G. 2006. Effective PCR detection of animal species in highly processed animal byproducts and compound feeds. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*: 385(6): 1045-1054.
- Fumière 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 feedingstuffs. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*: 13(S): 59-70.
- Gudnason H, Dufva M, Bang DD, Wolff A. 2007. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Research*: 35(19): e127.
- Huamancha L. 2017. 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 de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 28 p.
- Infante C, Crespo A, Zuasti E, Ponce M, Pérez L, Funes V, *et al.* (2006). PCR-based methodology for the authentication of the Atlantic mackerel *Scomber scombrus* in commercial canned products. *Food Research International*: 39(9): 1023-1028.

- Khan CM. 2007. Manual Merck de Veterinaria. Barcelona, España: Oceano.
- Klančnik A, Kovač M, Toplak N, Piskernik S, Jeršek B. 2012. PCR in food analysis. En: Hernandez P, editor. Polymerase chain reaction. In tech. p 195-220.
- Krcmar P, Rencova E. 2005. Quantitative detection of species-specific DNA in feedstuffs and fish meals. Journal of food protection: 68(6): 1217-1221.
- Loftis AD, Reeves WK. 2012. Principles of real-time PCR. En: Wang C, Kaltenboeck B, Freeman MD, editores. Veterinary PCR diagnostics. Bentham E Books. p 3-17.
- Luna N. 7 de Agosto de 2017. El círculo pesquero en el Perú. La República. Recuperado de: <http://larepublica.pe/economia/1070777-circulo-pesquero-en-el-peru>
- Martin de la Torre I, García Lacarra T, Martín de Santos R. 2008. Detección de ADN de pescado en piensos vegetales mediante una técnica de PCR en tiempo real. RCCV: 2(2).
- Myers MJ. 2005. Detecting animal tissues in feed and feed ingredients. En: Sofos J, editor. Improving the safety of fresh meat. Cambridge: Woodhead Publishing Limited. p 56-76.
- Neogen corporation. 2007. Reveal procedure for Ruminant MBM. EEUU: Neogen Food Safety.
- Nomura T, Kusama T, Kadowaki K. 2006. Detection of fish DNA in ruminant feed by PCR amplification. Journal of the Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi): 47(5): 222-224.
- Pesquera Exalmar SAA. 2016. Memoria anual 2016. Lima, Perú. 65 p. Recuperado de: <http://www.exalmar.com.pe/wp-content/uploads/2017/02/Memoria-Anual-2016-1.pdf>
- Prado M, Boix A, von Holst C. 2012. Novel approach for the simultaneous detection of DNA from different fish species based on a nuclear target: quantification potential. Anal Bioanal Chem: 403: 3041-3050.

- Prado M, Boix A, von Holst C. 2013. Development of a real-time PCR method for the simultaneous detection of mackerel and horse mackerel. *Food Control*: 34: 19-23.
- QIAGEN. 2014. DNeasy mericon food handbook. Alemania: Qiagen – Sample & assay technologies. 32p.
- van Raamsdonk LWD, von Holst C, Baeten V, Berben G, Boix A, de Jong J. 2007. New developments in the detection and identification of processed animal proteins in feed. *Animal feed science and technology*: 133: 63-83.
- Rasmussen R. 2012. Quantification on the LightCycler. En: Meuer S, Witter C, Nakagawara K, editores. *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications*. Berlin: Springer. p 21-34.
- Rehbein H, Mackie IM, 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). *Informationen für die Fischwirtschaft aus der Fischereiforschung*: 42(4): 209-212.
- Requejo JC. 12 de Febrero de 2016. Declaración del exviceministro de Pesca y Acuicultura del Ministerio de Producción (Produce) Juan Carlos Requejo. Recuperado de: <http://www.andina.com.pe/agencia/noticia-produce-peru-es-principal-abastecedor-harina-pescado-el-mundo-598654.aspx>
- Safdar M, Junejo Y. 2015. Development and validation of fast duplex real-time PCR assays based on SYBER Green fluorescence for detection of bovine and poultry origins in feedstuffs. *Food chemistry*: 173: 660-664.
- Sovová T, Křížová B, Drábková L, Ovesná J. 2017. Detection of PCR inhibition in food and feed with a synthetic plasmid. *Czech J. Food Sci*: 35(2): 160-164.
- Thermo Fisher Scientific. 2010. Thermo Scientific Nanodrop spectrophotometers – Nucleic Acid. Rev. 11/2010. Wilmington, EEUU: Thermo Fisher Scientific Inc. 30 p.