

Daniel Martín Santana^{1,2}

Amparo Martínez Martínez²

Juan Vicente Delgado Bermejo²

¹ Fundación Canaria Dr. Manuel Morales.

² Departamento de Genética Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edif. C-5, 14014 Córdoba

Empleo de microsatélites de ADN para asignación de identidad en la trazabilidad del caprino

ANTECEDENTES. CONCEPTO Y APLICACIÓN DE LA TRAZABILIDAD GANADERA

Introducción

Aunque un número importante de las explotaciones caprinas de Europa son de carácter lechero, muchas de ellas se han dedicado a la producción cárnica. En ese sentido, la cría de cabritos para carne ha tenido un papel importante en la ganadería caprina en diversas zonas de España, sobretodo en aquellas con arraigo a las tradiciones. Hasta la actualidad el mercado de la carne se ha visto sometido en el transcurso de los años a gran cantidad de fraudes de todo tipo. Así mismo, la carne es uno de los elementos de nuestra dieta más susceptible a distintos riesgos potenciales dentro de la cadena alimentaria. Por todo ello, surge con fuerza la palabra trazabilidad. Esto es uno de los aspectos que más preocupa al consumidor, que está demandando una carne identificada con un origen conocido.

La trazabilidad entendida como el registro de los elementos referidos a un alimento de origen animal desde el nacimiento del mismo hasta su comercialización y consumo, ha adquirido una gran importancia debido a la intensa política de seguridad alimentaria que se está practicando en la UE. La Directiva 178/2002, en su artículo 18, ya da las primeras pautas que en materia de trazabilidad hay que mantener para un buen registro de producción.

Concepto de trazabilidad

En su sentido más amplio, se acepta la definición que se recoge en el Reglamento CE 178/2002 en la que se define como *la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución, de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia*

destinados a ser incorporados en alimentos o piensos o con probabilidad de serlo. El Código Alimentario la define como la habilidad para seguir el movimiento de un alimento a través de los pasos específicos de producción, procesado y distribución.

En cualquier caso, la trazabilidad no es un objetivo en sí misma sino una herramienta con múltiples aplicaciones. Con carácter general, todo producto o alimento destinado al consumo humano procedente de la ganadería (carne, leche, huevos, miel) es susceptible de sufrir un registro permanente en cualquiera de los pasos de la cadena alimentaria en que se encuentre.

Aplicación

El concepto, aplicado a los ganaderos, conduce al mantenimiento de información que permita identificar de donde proceden los factores empleados en la producción, así como el destino del producto final. Según la Directiva Europea, es papel del ganadero ponerlo en práctica en materia de identificación y registro de los animales, comercialización, aplicación de medicamentos, etc.

Teniendo en cuenta que el ámbito de la trazabilidad es el de la cadena global y no el de un eslabón individual, se considera necesaria la intervención y colaboración entre todos los participantes en el proceso. La aplicación del sistema de trazabilidad debe ser entendible por todos los agentes. Y, al mismo tiempo, y con el ánimo de conseguir la máxima eficiencia, debe facilitar la automatización de los procesos de captura, registro y transmisión de la información necesaria.

Por tanto, para llevarla a cabo, se hace necesario, entre otras cosas, asegurarse de la identificación del animal de tal forma que se pueda realizar una posterior asignación de identidad al producto final. Existe una abundante legislación al respecto de la identificación y el registro de los animales que garantiza una correcta información sobre su origen e identidad individual (Tabla 1).

Tabla 1.
Referencias destacables sobre legislación europea y española en materia de identificación y registro de animales de abasto

Especie	Normativa Europea	Normativa Nacional
Bovino	Reglamento 1760/2000 Reglamento 911/2004	R.D. 1377/2001
Porcino		R.D. 342/2000
Ovino y caprino	Reglamento 21/2004	R.D. 947/2005
Équidos	Decisión 93/623/CE Decisión 2000/68/CE	R.D. 1133/2002
Todas		R.D. 479/2004 R.D. 1716/2000 R.D. 205/1996 Ley 8/2003

En este conjunto de directrices se recogen las herramientas disponibles para mantener en todo momento la trazabilidad del ganado: registros de explotaciones, libros de registro (entrada y salida de animales), certificados sanitarios de origen. Pero el requisito indispensable es la identificación animal, necesaria en cualquier tipo de registro a efectuar en explotación. El Reglamento 21/2004 contempla la identificación electrónica para el ganado ovino y caprino como herramienta para lograr la trazabilidad en origen.

En ese campo, líneas de investigación a nivel europeo han arrojado considerables avances en materia de trazabilidad en vacuno, porcino y ovino (Caja et al., 2004), basados en la transferencia de identidad del animal a la carne mediante la identificación de esta gracias al empleo de marcadores de ADN.

MICROSATÉLITES

Generalidades

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN concierto grado de variación o polimorfismo, que permiten seguir la herencia de un segmento de cromosoma de una generación a otra. Este tipo de marcadores pueden detectarse a través de tecnologías modernas relativamente fáciles de realizar y de interpretar y que pueden ser estudiados a partir de muestras pequeñas de ADN extraído de cualquier tejido animal (sangre, pelo, leche, semen, tejido muscular, hueso).

En el caso de los microsatélites el polimorfismo radica en la existencia de un número variable de repeticiones en tándem de una secuencia de ADN no codificante. Las unidades que se repiten son pequeñas (de 1 a 6 nucleótidos), y el número de repeticiones que presentan es relativamente pequeño, por lo que se ponen de manifiesto fácilmente. Gracias a su alta densidad en el genoma, donde se encuentra distribuido totalmente al azar, su facilidad de detección y su polimorfismo, han sido desde su

descubrimiento los marcadores de elección y por tanto los más utilizados para muchas aplicaciones: pruebas de identificación individual, control de filiación y paternidad, caracterización de poblaciones, mapeo génico, etc. Se detectan gracias a la técnica de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en reacciones multiplex (combinación de microsatélites que permite su amplificación conjunta). La lectura se realiza gracias a la separación mediante electroforesis de los distintos fragmentos de ADN amplificados.

Huella genética

El hecho de que un individuo posea un determinado genotipo en los marcadores analizados permite hablar de lo que frecuentemente se ha denominado una *huella genética*. Esta es única y se detecta fácilmente mediante técnicas moleculares lo que permite la identificación del individuo en todo momento y circunstancia. La trazabilidad es una de las consecuencias de la posibilidad de identificación individual que nos permiten los marcadores moleculares mediante la *probabilidad de identidad*. Este término se aplica a la capacidad de identificar una muestra anónima y seguir su rastro hasta su origen (ej; procedencia de la carne) y se fundamenta en las mismas técnicas aplicadas en Medicina Forense, a partir de dicha huella genética.

Por tanto, *probabilidad de identidad se entiende como aquella probabilidad de encontrar dos individuos diferentes con genotipos idénticos para un determinado número de loci* (en este caso microsatélites). Las aplicaciones son importantes en cuanto a que se garantizan las características del ser vivo que ha dado lugar al producto elaborado. También se puede contrastar la presencia o ausencia de restos de animales o vegetales en productos elaborados. El empleo de microsatélites de ADN para asignación de identidad y trazabilidad del ganado y de la carne ha sido propuesto en diversos trabajos (Cunningham y Meghen, 2001).

DETERMINACIÓN DE IDENTIDAD A PARTIR DE MICROSATÉLITES DE ADN EN GANADO CAPRINO

Reiterando que el enfoque de los estudios sobre trazabilidad e identidad ha estado dirigido a la producción de carne de vacuno, porcino y ovino, los trabajos a nivel internacional en caprino son prácticamente inexistentes, y en cualquier caso las referencias encontradas son muy generales (Cunningham y Meghen, 2001). Por otro lado, aunque la mayoría de las explotaciones caprinas son de carácter lechero, cada vez tiene mayor importancia la producción de cabritos, ya no solo en los países menos desarrollados sino en España, donde su consumo no solo ha estado ligado a unos sistemas de producción con un fuerte condicionamiento cultural (p. ej: cabra de desvío en Canarias, explotación tradicional de Blanca Andaluza y Celtibérica, etc.) sino que se ha visto beneficiado por la aparición de nuevos sistemas como la lactancia artificial. Fruto de este hecho, desde el grupo de investigación PAI-AGR 218 de la Junta de Andalucía se ha venido desarrollando una metodología en materia de trazabilidad para el caprino en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada situada en el Centro de Fomento Pecuario de la Diputación de Córdoba.

Muestreo e identificación animal

Para asegurar un protocolo correcto de trazabilidad, se debe contar con una identificación permanente de los animales. En el caso del caprino, se puede considerar la identificación electrónica como el método preferente, no sólo por su precisión sino por el alto grado de automatismo que presenta y la enorme fiabilidad del dato que arroja.

En ese sentido, existen trabajos sobre identificación electrónica en caprino valorando el grado de retención del bolo ruminal (Capote et al., 2005) y la inocuidad del mismo (Martín et al., 2005).

Una de las ventajas que presenta el análisis de microsatélites es que el ADN puede extraerse de forma sencilla a partir de las muestras tomadas, independientemente del origen de las mismas (sangre, bulbo del pelo, leche, semen). Así mismo, se pueden conservar durante largos periodos de tiempo, facilitando la posibilidad de crear bancos de muestras. El análisis de microsatélites en una población será más riguroso cuanto menor grado de parentesco haya entre los individuos que componen la muestra en estudio.

Selección de microsatélites

Tanto la FAO (2004) como la ISAG (*International Society of Animal Genetics*) han propuesto en los últimos años una serie de microsatélites para su uso en estudios de biodiversidad genética. Hay que decir que el comportamiento de los microsatélites puede variar según la raza o población en estudio, por lo que hay que tener un claro conocimiento no solo de dicho comportamiento sino de

la estructura poblacional (presencia de variedades o estirpes).

Análisis de microsatélites

La probabilidad de identidad, va a depender fundamentalmente de las frecuencias genotípicas (y por tanto alélicas) de cada uno de los microsatélites, ya que la aparición de frecuencias bajas aportará un mayor poder de discriminación entre individuos. Por consiguiente, a efectos de buscar un panel de microsatélites para realizar pruebas de identidad, la elección de los marcadores se ve condicionada por el contenido en información polimórfica (PIC) que presentan. Es decir, habrá unos marcadores que se puedan considerar más informativos por el hecho de que arrojen un mayor número de alelos posibles y distribución de frecuencias genotípicas para una población concreta.

En la Tabla 2 se muestran los datos obtenidos para algunos microsatélites considerados como más informativos ($PIC > 0.5$) en la cabra Blanca Andaluza en trabajos realizados en el último año, siendo similares a los observados por Martínez et al. (2004). El nivel de heterocigocidad media observada, o lo que es lo mismo, el porcentaje de heterocigotos en la población (valor relacionado con el nivel de diferenciación genética entre los individuos) fue bastante alto y acorde con la esperada estadísticamente teniendo en cuenta la distribución de las frecuencias alélicas. Sin embargo esa norma no se cumplió en alguno de los microsatélites como CSSMM66, marcador que a pesar de tener bastante potencial de información con un PIC elevado, el nivel de heterocigotos observados es bastante inferior al esperado. En cualquier caso, el comportamiento de los microsatélites fue similar en los dos trabajos.

De este modo, serán candidatos a configurar un panel de genotipado para identidad aquellos microsatélites con mayor PIC y distribución alélica, ya que a partir de esta se determina la probabilidad de identidad de cada uno, y el poder de discriminación total del panel. Esto será posible siempre y cuando se comporten en equilibrio con el paso de las generaciones para una población dada o raza concreta.

Una de las consecuencias prácticas de este hecho es que para asegurar una discriminación correcta entre individuos con un nivel de fiabilidad muy cercana al 100 por 100, será necesario el empleo de un número de marcadores limitado, como ocurre con las pruebas de filiación basadas en la probabilidad de exclusión. En la Tabla 3 se muestra un ejemplo práctico sobre esta consideración, aplicado a un individuo escogido al azar, donde se observa que con la utilización de 10 de estos microsatélites, se obtiene una probabilidad de encontrar el mismo genotipo de 1 entre $7,2 \times 10^{12}$ a partir de las frecuencias observadas.

Por otro lado, la disponibilidad de medios económicos es fundamental. El coste del análisis aumenta proporcionalmente con el número de marcadores empleados. De ese

Tabla 2. N° de alelos, heterocigocidad esperada (Hesp) y observada (Hobs), y contenido en información polimórfica (PIC) en distintos microsatélites para la cabra Blanca Andaluza

Martín et al. (2005) n=40				
Microsatélite	N° alelos	Hesp.	Hobs.	PIC
BM1818	8	0,81	0,80	0,78
MM12	13	0,89	0,82	0,88
OarFCB48	9	0,81	0,77	0,79
CSRM60	6	0,79	0,87	0,76
CSSM66	12	0,85	0,52	0,84
INRA6	9	0,78	0,69	0,75
OarFCB11	8	0,84	0,65	0,82
MAF65	9	0,85	0,92	0,84
BM 1329	8	0,82	0,82	0,80
BM6506	7	0,77	0,82	0,74
BM6526	11	0,69	0,62	0,65
CSRD247	6	0,75	0,70	0,70
HSC	11	0,80	0,77	0,77
TGLA122	7	0,70	0,57	0,68
ILSTS011	6	0,71	0,70	0,67

Tabla 3. Efecto del número de microsatélites en la probabilidad de encontrar dos individuos idénticos (PI) para un caso supuesto

Microsatélite	Alelo 1	Alelo 2	Frecuencia genotípica*	PI acumulada	Discriminación (1/PI)
1	258	260	0,1246875	0,1246875	8
2	280	280	0,11390625	0,014202686	70
3	218	218	0,08265625	0,001173941	852
4	151	153	0,061875	7,2x10 ⁻⁰⁵	13767
5	169	179	0,05625	4,0x10 ⁻⁰⁶	244747
6	286	292	0,045	1,8x10 ⁻⁰⁷	5438806
7	94	112	0,0446875	8,2x10 ⁻⁰⁹	1,2x10 ⁸
8	101	121	0,03157002	2,5x10 ⁻¹⁰	3,8x10 ¹⁰
9	132	140	0,028125	7,2x10 ⁻¹²	1,3x10 ¹¹
10	133	133	0,01890625	1,3x10 ⁻¹³	7,2x10 ¹²

modo, dicho coste podrá variar en función del poder de identidad global que se quiera conseguir, utilizando distintas combinaciones. De forma general, con el fin de conseguir el máximo rendimiento económico, la configuración del panel debería cumplir los siguientes requisitos:

- Que se pueda desarrollar la amplificación en el menor número de combinaciones de reacción posibles.
- Y que el tamaño de los fragmentos permita distribuirlos en una sola electroforesis.

CONSIDERACIONES FINALES

- Para asegurar la trazabilidad en todo el proceso de producción animal, el primer punto a considerar es la identificación del producto en el origen, siendo clave la identificación animal.
- Debe existir un protocolo de transferencia de identidad inviolable, del animal a la carne.
- El genotipado mediante microsatélites de ADN se puede aplicar bien tanto en animal vivo como en pieza cárnica.
- El empleo de un panel de microsatélites con un gran poder de discriminación asegura la asignación de muestras cárnicas a individuos de origen a través de la comparación de las mismas.
- Además, no solo sirve como método de identificación individual (ej., rastreo de semen) sino como discriminador racial con vistas a los productos englobados en Denominaciones de Origen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caja G., Ghirardi J.J., Hernández-Jover M., Garín D. 2004. Diversity of animal identification techniques: from fire age to electronic age. ICAR Technical Series. Vol 9. 21, 41.
- Capote J., Martín D., Castro N., Muñoz E., Lozano J., Carné S., Ghirardi J.J., Caja G. 2005. Retención del bolo ruminal para identificación electrónica en cabras de distintas razas españolas. XI Jornadas AIDA, Zaragoza, pag. 297.
- Cunningham E.P., Meghen C. 2001. Rastreabilidad de animales y productos de origen animal. Sistemas de identificación biológica: marcadores genéticos. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,20: 491-499.
- FAO. 2004. Working group on animal genetic resources for food and agriculture. Measurement of domestic animal diversity – A review of recent diversity studies. 3rd Session, Rome.
- Martín D., Castro N., Castroalonso A., Argüello A., Capote J. 2005. Identificación electrónica con bolo ruminal en ganado caprino lactante, joven y adulto. Peq. Rumiantes 6: 1, 8-12.
- Martín D., Martínez A., Quiroz J., Camacho M.E., Lozano J.M., Delgado J.V. 2005. Comunicación personal.
- Martínez A.M., Carrera M.P., Acosta J.M., Rodríguez-Gallardo P.P., Cabello A., Camacho M.E., Delgado J.V. 2004. Genetic characterisation of the Blanca Andaluza Goat based on microsatellite markers. South African Jour. Of Anim. Sci. 34 (1) 17-19.

