

IMPLEMENTACIÓN DE UN SISTEMA DE TRAZABILIDAD MOLECULAR PARA LA CARNE BOVINA BASADO EN MARCADORES MICROSATÉLITES

Implementation of a molecular system for traceability of bovine meat based on microsatellites markers

Ricardo Felmer D.^{1*}, Boris Sagredo D.², Renato Chávez R.^{1,3}, Sergio Iraira H.², Carolina Folch M.², Lorena Parra G.¹, Adrián Catrileo S.¹, Manuel Ortiz L.⁴.

ABSTRACT

Animal products traceability has acquired great relevance as a security element after the food crisis occurred in the middle nineties in countries of the European Community. This has motivated a reinforcing of capacities of management of cattle products quality, arising traceability as the main tool to prevent security and quality risks of the products that consumers of developed countries demand. The practical application of a traceability system of bovine meat based on molecular markers requires the election of a panel of microsatellites as well as the optimization of methods of sampling and DNA analysis. In this work, a traceability system of bovine meat based on a panel of 10 microsatellites markers was implemented. Different biological samples were evaluated such as hair, blood, tissue and meat. Hair samples were the most suitable because they are easy to obtain and manipulate and have a low cost of storage; whereas in the food processing chain, meat samples were the most suitable due to its facility of obtaining at the maturation room. The traceability system was evaluated in a meat processing plant, confirming traceability of 150 samples of hair with its respective meat pairs with a 100% of certainty, demonstrating reliability of the developed method. The implemented system is an important contribution since it allows to guarantee the quality of animal products, and can be used as a tool to certify conventional traceability systems. This would allow to increase competitiveness of this sector and to generate greater confidence in the consumer.

Key words: traceability, microsatellites, individual identification, beef.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile. E-mail: rfelmer@inia.cl * Autor para correspondencia.

² Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Remehue, Casilla 24-D, Osorno, Chile.

³ Dirección actual: Universidad de Santiago de Chile, Facultad de Química y Biología, Casilla 40, Correo 33, Alameda 3363, Santiago, Chile.

⁴ Universidad Austral de Chile, Centro de Inseminación Artificial, Casilla 567, Valdivia, Chile.

Received: 16 agosto 2007.

Aceptado: 23 noviembre 2007.

INTRODUCCIÓN

El aumento del comercio globalizado y la necesidad de garantizar inocuidad y calidad de los alimentos, exige a los países exportadores garantizar el origen de sus productos. Esto último como una forma de evitar que se repitan problemas como los vividos en Europa a fines de los noventa, generados principalmente por la difusión de patologías como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y ovina (Scrapie), fiebre aftosa y peste porcina clásica (PPC), así como la detección de hormonas, anabolizantes, antibióticos, pesticidas, plomo y/o patógenos en alimentos o productos de origen animal. Por otra parte, el aumento del riesgo de ataques bioterroristas también es considerado un factor de seguridad en los alimentos, principalmente en EE.UU. y la Comunidad Europea. Esta situación contribuyó a que los principales mercados desarrollaran una serie de regulaciones y medidas tendientes a controlar estos riesgos en la salud humana para asegurar la confianza del consumidor. La consecuencia directa en los países exportadores fue el establecimiento de políticas de identificación y seguimiento individual de los animales y sus productos, mediante la aplicación de nuevas tecnologías adaptadas a la modernización y globalización de los intercambios comerciales actuales, siendo la trazabilidad uno de los principales resultados de estas políticas (Council of the European Communities, 2000).

En general, la trazabilidad es un conjunto de acciones, medidas y procedimientos técnicos que permiten identificar y registrar un producto desde su origen hasta el final de la cadena de comercialización (Fernández, 2002). En el caso particular de la carne, esto significa su seguimiento en toda la cadena de producción, desde el nacimiento del animal, pasando por la crianza y prácticas ganaderas en el predio, transporte, faenamiento, hasta su venta al detalle. En todo este proceso se debe asegurar la identidad del producto, como una forma de garantizar su inocuidad y calidad, lo que permite que ante cualquier problema, se pueda rastrear su paso por la cadena productiva hasta el predio donde nació el animal.

Uno de los principales requisitos de la trazabilidad es la implementación de un sistema de identificación animal. Al respecto, existen actualmente en aplicación o desarrollo diversos sistemas tanto biométricos como no biométricos (Felmer *et al.*, 2006). Entre los primeros destacan la huella nasal, imágenes digitales de retina e iris y la huella genética de ADN (Masahiko *et al.*, 2001; Chávez *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2004). Dentro de los métodos no biométricos se pueden utilizar los tatuajes, marcas de fuego, marcas de frío, crotales o caravanas, chips electrónicos, bolos ruminales, transponders, etc. (Caja *et al.*, 2000; Ribó *et al.*, 2001; Conill *et al.*, 2002).

En el caso de Chile, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) ha dispuesto un dispositivo de identificación individual oficial (DIIO) correspondiente a un crotal o arete de color amarillo, que tiene un número único nacional correlativo para cada cabeza de ganado (SAG, 2006). Sin embargo, si bien estos sistemas de identificación tienen la ventaja de ser fáciles de leer, durables e inocuos, la mayoría son removidos del producto final, la carne, una vez que el animal ingresa al matadero. Sería deseable entonces disponer de un sistema de respaldo o certificación que pueda asegurar la trazabilidad del animal *post-mortem*, para evitar errores en la identificación, fraudes o adulteraciones después del sacrificio. Una buena alternativa de identificación animal la constituye el ADN, presente en las células de todos los tejidos tanto de animales vivos como de cualquier producto derivado de éste. De esta forma, el ADN representa la mejor marca natural e inviolable que puede ser utilizada en la trazabilidad de la carne (Vázquez *et al.*, 2004).

El principio de la identificación genética animal se basa, con la excepción de los gemelos monocigóticos y los animales clonados, en que todos los individuos de una población difieren entre sí a nivel de su ADN (Cunningham y Meghen, 2001), haciendo factible realizar una prueba genética que utiliza marcadores moleculares para establecer estas diferencias (Lodish *et al.*, 1995). Los microsatélites se han convertido actualmente en la herramienta molecular de elección para análisis genético y para estudios de identificación animal ya que poseen tres características fundamentales: i) segregan siguiendo un patrón de herencia mendeliana; ii) se encuentran distribuidas en todo el genoma, y iii) se componen de unidades repetitivas conservadas (dos a seis pares de bases), pero que varían en el número de repeticiones (Tautz, 1989; Visscher *et al.*, 2002). Esta última característica permite encontrar una gran diversidad de tamaños en los microsatélites analizados, los cuales se pueden detectar mediante diversas técnicas de biología molecular actualmente disponibles (Blott *et al.*, 1999).

El objetivo de este estudio fue implementar un sistema de trazabilidad molecular de la carne bovina en Chile, empleando un panel de marcadores moleculares (microsatélites) específicos del bovino e identificar las mejores muestras biológicas que pueden ser utilizadas por este sistema, para garantizar el origen de los productos bovinos y certificar el adecuado funcionamiento de los actuales sistemas de trazabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas

El estudio se realizó entre los años 2005 y 2006. Se recolectaron muestras correspondientes a alrededor de 200 animales pertenecientes a distintos rebaños distribuidos en las Regiones de La Araucanía (38°46' S, 72°38' O) y de los Lagos (43°36' S, 73°4' O), Chile. Las muestras de diferentes tejidos se recolectaron en predios, mataderos y salas de desposte. Las muestras de pelo (folículo piloso), biopsias de tejido de la

oreja y sangre se obtuvieron en los predios de acuerdo a métodos descritos previamente (Chávez *et al.*, 2004). Las contramuestras de la canal se obtuvieron desde la línea de proceso (sala de maduración) o desde la sala de desposte de las plantas de faenamiento de Carnes Ñuble (Chillán) y GANASUR (Osorno) (Chávez *et al.*, 2004).

Purificación de ADN desde muestras biológicas y análisis de microsatélites

La purificación de ADN a partir de las muestras de pelo, tejido y/o sangre, se realizó de acuerdo a los métodos descritos previamente (Chávez *et al.*, 2004; Folch *et al.*, 2004). Se utilizaron 10 marcadores microsatélites, los cuales corresponden a los incluidos en el StockMarks for Cattle® (Applied Biosystems, Foster, California, EE.UU.). Estos marcadores se seleccionaron por su gran contenido de información polimórfica (PIC) y porque son recomendados por la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, Oxford, Reino Unido) como marcadores estándares para la comparación de bovinos. Estos marcadores se distribuyeron en 3 reacciones múltiplex, de acuerdo a las condiciones de amplificación descritas en Chávez *et al.* (2004) y Folch *et al.* (2004). Los productos de PCR obtenidos se analizaron en un equipo de secuenciación automática (ABI PRISM 310, Applied Biosystems, Foster, California, EE.UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante o mediante geles de poliacrilamida y tinción con plata (Folch *et al.*, 2004).

Evaluación del poder de discriminación de los microsatélites seleccionados

Para evaluar el poder de los microsatélites para discriminar entre diferentes individuos, se muestrearon 52 y 63 animales, de las razas overo negro y overo colorado, respectivamente, a los que se les determinó el genotipo de los 10 marcadores microsatélites. El grupo ON correspondió al rebaño lechero overo negro del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación Carillanca, Temuco. Las muestras OC correspondieron a novillos de tres grupos de overos colorados de la Región de los Lagos. La frecuencia alélica en estos animales se determinó por recuento directo de los alelos obtenidos. Para cada marcador se obtuvo el número de combinaciones alélicas y el número de genotipos únicos. De acuerdo a la frecuencia de alelos se determinó el contenido de información polimórfica (PIC) en las diferentes poblaciones para cada uno de los marcadores, según la fórmula de Botstein *et al.* (1980). Además, se determinaron los valores esperados de los índices de confusión (C_j), discriminación (D_j) y número de pares posibles de ser confundidos (X_j) según Tessier *et al.* (1999), y los respectivos valores observados se obtuvieron por análisis de agrupamiento según Mathias *et al.* (2007).

Evaluación de la trazabilidad en una planta de faenamiento

Para evaluar el sistema de trazabilidad molecular en una planta de faenamiento de carne (**Figura 1**), se muestrearon 150 animales en distintos predios de las Regiones de la Araucanía y de Los Lagos, cuyas canales ingresarían a los Frigoríficos FRIGOSOR y Carnes Ñuble, ya que correspondían a predios PABCO A (Predios Bajo Control Oficial), cuya carne estaba destinada a los mercados de la Unión Europea. Los animales se muestrearon en los predios (folículo piloso) coincidiendo con el momento en que se les colocaba el dispositivo de identificación individual oficial (DIIO) implementado por el SAG. Las contramuestras de carne de la canal se obtuvieron una vez que los animales ingresaron al matadero, donde fueron identificados con su respectivo número de crotal y número interno asignado por la planta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación de microsatélites

En la **Figura 2** se observa el resultado del análisis de microsatélites en múltiplex y su visualización mediante dos sistemas de análisis. El primero consiste en la detección mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con plata. En esta técnica los distintos alelos de un microsatélite migran en una matriz de poliacrilamida gracias a la aplicación de un potencial eléctrico, separándose de acuerdo a sus diferencias en tamaño. De esta forma, empleando un estándar de tamaño molecular adecuado, se puede establecer el patrón de polimorfismos y moléculas de ADN que permiten establecer la identidad de las muestras analizadas (Folch *et al.*, 2004). En la **Figura 2A**, por ejemplo, se aprecia la identidad genética de tres muestras de animales analizadas con los microsatélites INRA 23, TGL122 y TGLA 227. Como se desprende de la figura, las tres muestras analizadas tienen su propio perfil de bandas, confirmando que corresponden a distintos animales, aún cuando algunos alelos puedan ser compartidos (ej. alelos del microsatélite TGLA 227 en muestras 1 y 3).

El segundo método de detección evaluado corresponde al de electroforesis capilar en secuenciador automático (**Figura 2B**). Este sistema utiliza oligonucleótidos marcados con distintos compuestos químicos fluorescentes, los cuales luego de su amplificación por PCR pueden ser analizados simultáneamente por el detector del secuenciador. Este sistema, además de discriminar los fragmentos de ADN por tamaño, puede identificarlos por la fluorescencia que emite el fluoróforo. De esta forma, el método permite un rango mayor de flexibilidad para establecer los múltiplex, además de su mayor velocidad y automatización (Chávez *et al.*, 2004). En la **Figura 3B** se muestra el ejemplo de un electroferograma obtenido en el secuenciador automático. En este caso, la reacción múltiplex incluyó cuatro marcadores microsatélites (ETH3, ETH225, INRA23 y BM2113). El tamaño de los alelos de estos

marcadores es asignado directamente por el equipo, en comparación con un estándar interno de tamaño que se corre junto con las muestras. De esta forma quedaron definidas las condiciones óptimas para la utilización de los 10 microsátélites en tres reacciones múltiple tanto para el secuenciador automático como para el sistema de geles de poliacrilamida (Chávez *et al.*, 2004; Folch *et al.*, 2004).

Muestra biológica

La aplicación del sistema de trazabilidad molecular requiere del muestreo del animal vivo y sus productos derivados (carne) en las diferentes etapas de la cadena de producción, desde el ternero, la carcasa y finalmente la carne (**Cuadro 1**). En este estudio se evaluaron diferentes muestras biológicas del animal tomadas en las distintas etapas de la cadena productiva, encontrándose que en general todas las muestras pueden ser utilizadas para el análisis (**Cuadro 2**). Sin embargo, existen diversos factores que deben considerarse al momento de elegir la muestra a utilizar. En el caso de la muestra del animal vivo (*pre-mortem*) es importante considerar, entre otras cosas, el almacenamiento, ya que la muestra deberá permanecer guardada hasta que el animal sea faenado. La extracción de ADN desde la muestra es otro factor importante a considerar. Aunque fue posible obtener ADN desde la saliva, la baja higiene de esta muestra, sumado a las mayores dificultades para su obtención, hicieron a este método muy poco práctico (dato no mostrado). En el caso de la sangre, un primer inconveniente es su manejo, pues es necesario tomar la muestra desde el animal, lo que hace más laboriosa su obtención si se tiene un gran número de animales; además, este procedimiento está restringido a Médicos Veterinarios en algunos países como Inglaterra y Escocia (Bruce Whitelaw, Instituto Roslin, Escocia, comunicación personal). Finalmente, estas muestras deben almacenarse refrigeradas hasta su uso, evitando su coagulación. Aunque los resultados de este estudio confirmaron su potencial utilización (**Cuadro 2**), existe además el inconveniente de que muchos componentes de la muestra, incluida la hemoglobina, inactivan las ADN polimerasas necesarias para la amplificación de los microsátélites, pudiendo afectar la reproducibilidad de los resultados (Panaccio y Lew, 1991).

Las biopsias de tejido animal (oreja) resultaron una buena opción (**Cuadro 2**). Algunas empresas europeas han desarrollado un sistema de sacabocado que permite obtener muestras de tejido de la oreja al mismo tiempo que se aplica un crotal; este sistema comercial se denomina Biopsytec (Rheinbach, Alemania). La ventaja de este sistema es que la muestra es encapsulada en un recipiente rotulado e inviolable, quedando de esta forma sellada hasta su utilización en el laboratorio. Además, estos dispositivos pueden ser de tipo botón o bien de paleta ajustándose a los requerimientos de trazabilidad de cada país. Sin embargo, una desventaja de este sistema es su mayor costo.

Por lo anterior, el pelo aparece como una mejor opción ya que es de bajo costo, fácil obtención y almacenamiento. La ventaja de la muestra de pelo es que puede ser almacenada en bolsas de papel a temperatura ambiente o bajo refrigeración (4 °C). Sin embargo, hay algunos puntos importantes que también deben considerarse cuando se decide su uso, tales como evitar muestrear el animal en días lluviosos, ya que la humedad interfiere en los análisis de laboratorio (dato no mostrado). Además, el número de pelos también es importante, debiéndose obtener un gran número con el fin de elegir al menos 10 a 15 que tengan el folículo piloso visible. Finalmente, en lo posible se deben obtener pelos de color negro, ya que este color facilita la observación y el posterior manejo en el laboratorio. Pelos de color rubio deben evitarse, por cuanto en este estudio se observó que éstos contienen pigmentos que colorean las soluciones y pueden inhibir la reacción de PCR. Esta situación se vio reflejada por ejemplo en el análisis de una muestra de pelo de un animal de la raza Hereford, en el cual al menos dos microsátélites no pudieron ser amplificados en esta muestra (**Cuadro 2**, animal N° 2). Aunque esto no representaría un problema para determinar la correlación de dos muestras confrontadas, ya que ésta se puede establecer perfectamente con la información entregada por los otros microsátélites analizados. De esta forma, si es necesario analizar animales de la raza Hereford o Simmental, la recomendación sería muestrear un mayor número de pelos desde donde elegir los mejores para realizar el análisis.

En el caso de la muestra *post-mortem*, si bien el hueso y la grasa también se pueden utilizar, los métodos de purificación del ADN para este tipo de muestras son mucho más laboriosos. La obtención de un trozo de hueso o diente también supone un grado de dificultad mayor. De esta forma, la mejor muestra correspondió a un trozo de músculo (carne) de la canal, como puede ser el músculo *Longissimus dorsi* a nivel de la costilla 12-13, o bien de otro músculo de fácil acceso, muestra que puede tomarse adecuadamente desde la sala de maduración. Este lugar resultó ideal por varias razones: la circulación de personas es mínima, no existe peligro de contaminación con muestras biológicas de otros animales, y lo más importante, el tiempo. Una canal faenada usualmente madura 48 h, lo cual da un lapso de 2 días entre la faena y el desposte para la toma de esta contramuestra. Es importante destacar que en Chile los mataderos faenan los animales por lotes y no de manera individual. Por lo tanto, no fue posible evaluar las muestras después del desposte. Este es un punto relevante a considerar si se quiere realizar trazabilidad posmatadero, por ejemplo, con toma de muestras en los puntos de ventas (supermercados, carnicerías, etc.), como se hace en algunos países, los que han debido implementar un sistema de desposte en forma individual.

En conclusión, considerando la facilidad de obtención, extracción de ADN, almacenamiento y despacho al laboratorio, las mejores muestras a utilizar en un sistema de trazabilidad molecular de la carne

correspondieron a la muestra de pelo, como muestra inicial en el animal vivo, y un trozo de carne de la canal como contramuestra, obtenida convenientemente desde la sala de maduración del frigorífico.

Poder de discriminación del sistema

Una característica importante de la técnica de trazabilidad molecular es su capacidad de discriminar entre animales con una alta similitud genética. Esto significa que la técnica debe ser capaz de identificar muestras individuales, incluso si estas vienen de parientes cercanos, por ejemplo, medios hermanos, que a su vez pertenezcan a poblaciones en las cuales hay una alta consanguinidad, situación bastante frecuente en los sistemas de producción de bovinos. En el **Cuadro 3** se muestran las principales características de los marcadores en los dos grupos de bovinos analizados, overo negro (ON) y overo colorado (OC), con 52 y 63 animales, respectivamente. Estos animales corresponden a razas europeas introducidas a Chile hace más de 100 años (Mujica, 2005).

Como se muestra en el **Cuadro 3**, todos los marcadores presentaron un alto grado de polimorfismo, variando el número de alelos desde 4 a 9 y 4 a 12, para los grupos ON y OC, respectivamente. Estos datos se correlacionan con lo obtenido con estos microsátélites en otras razas bovinas (Bedoya *et al.*, 2001; Zamora *et al.*, 2004). Además cada marcador fue evaluado según el valor del contenido de información polimórfica (PIC). Este parámetro es frecuentemente utilizado para medir la capacidad de los microsátélites para discriminar entre diferentes individuos y sus valores pueden variar entre 0 y 1, indicando un mayor nivel de polimorfismo o variación cuando el valor es más cercano a 1. De acuerdo a esto, el poder de discriminación encontrado para estos microsátélites en general fue alto, variando los índices de PIC entre 0,452 y 0,834 y entre 0,580 y 0,846 y los índices de discriminación esperados (D_j) entre 0,461 y 0,850 y entre 0,589 y 0,859, para los grupos ON y OC, respectivamente (**Cuadro 3**). Es importante destacar que la estimación del poder discriminatorio esperado (D_j) de cada microsátélite, al igual que el valor de PIC, dependen directamente de las frecuencias alélicas (Tessier *et al.*, 1999), por tanto corresponden a valores prácticamente idénticos, lo cual se confirmó con los resultados obtenidos (**Cuadro 3**).

Los valores de los índices de discriminación observados (D_o) variaron de 0,692 a 0,959 y de 0,791 a 0,972 para los grupos de ON y OC, respectivamente (**Cuadro 3**). En general, los valores observados para este índice (D_o) fueron más altos que los esperados (D_j), situación que tendería a disminuir al aumentar el número de animales incluidos en el análisis. Del mismo modo, la probabilidad de confusión de genotipos observada (C_o) fue más baja que la esperada (C_j) en ambos grupos, con rangos de C_o que variaron entre 0,041 a 0,308 para ON y 0,028 a 0,209 para OC, respectivamente (**Cuadro 3**). En todos los casos, se

confirmó que los valores observados para los 10 marcadores microsatélites analizados, presentaron un mejor poder de resolución que los valores esperados. Esto se puede ver más claramente cuando se compara el número de pares (X) que se pueden confundir, entre los valores observados (X_o) y esperados (X_j), para las poblaciones ON y OC (**Cuadro 3**).

De esta forma, respecto al uso combinado de todos los marcadores para la identificación animal, se puede establecer que los valores esperados y observados indican que sería necesario analizar una población de 5.678 y 869.608 animales para encontrar un par de individuos que se puedan confundir ($X = 1$) entre las poblaciones de ON y OC, respectivamente. En otras palabras, la posibilidad de confusión de un par de individuos que compartan el mismo patrón de marcadores es de 0,00018 y 0,00000115, respectivamente. Si se considera que la mayor dificultad para discriminar individuos se produciría al comparar individuos de un mismo rebaño y que el manejo reproductivo de las poblaciones analizadas de ON y OC es similar al manejo de la mayoría de los rebaños de Chile, donde se espera un grado de consanguinidad moderada (datos no mostrados), los resultados obtenidos sobre el poder de discriminación de estos marcadores son extrapolables al resto de la población bovina en Chile, permitiendo entonces la aplicación de este sistema para el análisis de cualquier población de bovinos en el país.

Evaluación de la trazabilidad en una planta de procesamiento

Sin duda que el procesamiento de animales en las plantas faenadoras representa quizás el punto más crítico del sistema de trazabilidad, debido a que la identificación original dada por un arete o crotal es reemplazada por un número interno de faenamiento en la planta procesadora, el cual debe mantenerse para identificar todos los cortes derivados de una misma canal. Considerando la alta certeza ($> 99,9\%$) de los métodos de identificación basados en polimorfismos de ADN, éstos constituyen una excelente herramienta de verificación de los sistemas de identificación animal adoptados por las plantas faenadoras. El análisis de microsatélites de 150 muestras de pelo con sus respectivas contramuestras de carne de la canal permitió confirmar la trazabilidad de las mismas con un 100% de certeza (**Cuadro 4**).

El análisis de los tamaños generados por los microsatélites de todas las muestras evaluadas demostró una completa coincidencia entre la muestra de pelo y su respectiva contramuestra de carne de la canal. Sólo en casos muy puntuales se obtuvo una baja señal en la lectura de un microsatélite, pero que en ningún caso interfirió con el análisis y la correlación de las muestras (**Cuadro 4**). En estos casos los problemas se presentaron en las muestras de pelo que requieren más cuidado para su obtención y análisis. Estos resultados indican que, en las condiciones analizadas, la técnica es absolutamente certera para identificar como iguales muestras provenientes de un mismo animal, demostrando el potencial de la tecnología

implementada para certificar los sistemas convencionales de trazabilidad puestos en marcha en el país, convirtiéndose en un importante elemento de control de calidad.

Para la aplicación práctica de este sistema, las muestras a ser evaluadas deberían obtenerse al azar en distintos puntos a lo largo de la cadena de producción, tanto en animales vivos en los predios, carcasas en el matadero, carne en las salas de desposte e incluso en los supermercados y carnicerías. El método implementado permite la toma de la muestra inicial de pelo en forma económica y conveniente, ya que el muestreo lo puede hacer el mismo productor o veterinario al momento del marcaje de los animales con el DIO. Estas muestras se pueden enviar fácilmente en un sobre al laboratorio, donde se pueden almacenar hasta su análisis, sin mayores costos para el laboratorio u organismo encargado del control de calidad del sistema. En el caso de la contramuestra, el muestreo lo puede realizar directamente personal del frigorífico o personal de control de calidad especialmente contratado para tal función, y no requiere de cambios importantes en los actuales procedimientos de la industria. De esta forma, el análisis de ADN debiera realizarse con muestras al azar, para controlar la trazabilidad de un animal desde el predio hasta la industria, o para la investigación de quejas o en cualquier otro caso donde sea requerido.

Es importante destacar que los costos del análisis se pueden reducir considerablemente (al menos en 40%) si se implementa un protocolo de identificación dirigida, esto es, no al azar sino que entre una muestra y una contramuestra que se presuponen idénticas. El análisis en este caso se puede realizar tan sólo con tres microsatélites altamente polimórficos, lo cual sería suficiente para garantizar la misma procedencia de una muestra, pues en un protocolo de identificación dirigida la probabilidad dada por tres microsatélites (1 en 1000 de coincidencia al azar) es altísima (Vázquez *et al.*, 2004). Sin embargo, si el análisis se hace para identificar una muestra de carne contra un grupo o lote, que sería la situación actual en las plantas de procesamiento de carne de Chile, el análisis debe necesariamente incluir un mayor número de marcadores, como los 10 evaluados en este trabajo.

El sistema implementado es un aporte importante al sector pecuario del país, ya que permite garantizar la calidad de los productos al ser utilizada como herramienta certificadora de la trazabilidad convencional, aumentando con esto la competitividad de este rubro y generando mayor confianza en el consumidor, tanto nacional como internacional, que demanda cada vez mayores garantías de la calidad del producto que está consumiendo.

CONCLUSIONES

Las mejores muestras biológicas determinadas para el sistema de trazabilidad, por su facilidad de obtención, manipulación y costo de almacenamiento, correspondieron a las muestras de pelo y como contramuestras la carne de la canal.

El sistema de trazabilidad implementado permitió confirmar la trazabilidad de 150 muestras de pelo con sus respectivas canales, con un 100 % de certeza, demostrando la confiabilidad del método desarrollado.

El sistema implementado es un importante aporte al sector pecuario del país, ya que permite garantizar el origen de los productos bovinos al ser utilizado como herramienta certificadora de la trazabilidad convencional.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado gracias al apoyo financiero del FDI-CORFO, Proyecto 03C9AT-01. Se agradece el apoyo técnico en la selección inicial de los microsatélites del Dr. Armand Sánchez de la Universidad Autónoma de Barcelona y a la Dra. Ana Domínguez Sanjurjo de la Universidad de Oviedo, por el envío de muestras de ADN de referencia.

RESUMEN

Implementación de un sistema de trazabilidad molecular para la carne bovina basado en marcadores microsatélites. Ricardo Felmer D.^{1*}, Boris Sagredo D.², Renato Chávez R.³, Sergio Iraira H.², Carolina Folch M.², Lorena Parra G.¹, Adrián Catrileo S.¹, Manuel Ortiz L.⁴. La trazabilidad de productos de origen animal ha adquirido gran relevancia como un elemento de seguridad ante las crisis alimentarias ocurridas a partir de mediados de los noventa en países de la Comunidad Europea. Esto ha reforzado la gestión de calidad en productos pecuarios, surgiendo la trazabilidad como la principal herramienta para disminuir los riesgos de seguridad y calidad de los productos que demandan los consumidores de países desarrollados. La aplicación práctica de un sistema de trazabilidad de la carne bovina basado en marcadores moleculares, requiere la elección de microsatélites y optimizar los métodos de muestreo y análisis de ADN. En este trabajo se implementó un sistema de trazabilidad de carne bovina basado en un

panel de 10 marcadores microsatélites. Se evaluaron diferentes muestras biológicas como pelo, sangre, tejido y carne de la canal, encontrándose que las muestras de pelo fueron las más idóneas por su facilidad de obtención, manipulación y costo de almacenamiento, mientras que la carne de la canal fue la contramuestra más adecuada, pudiendo obtenerse fácilmente en el frigorífico. El sistema se evaluó en una planta de procesamiento de carne, confirmando con un 100% de certeza la trazabilidad de 150 muestras de pelo con sus respectivas canales, demostrando la confiabilidad del método desarrollado. El sistema evaluado puede ser un importante aporte al sector pecuario del país pues permite garantizar el origen de los productos bovinos y puede ser utilizado como herramienta certificadora de la trazabilidad convencional, aumentando la competitividad y generando mayor confianza en el consumidor.

Palabras clave: trazabilidad, microsatélites, carne, identificación individual.

LITERATURA CITADA

Bedoya, G., L. Carvajal, N. Bermúdez, L. Fernando, M. Márquez, S. Davies, *et al.* 2001. Estructura molecular y poblacional del ganado criollo Colombiano. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 14:109-120.

Blott, S., J. Williams, and C. Haley. 1999. Discriminating among cattle breeds using genetics markers. *Heredity* 82:613-619.

Botstein, D., R. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Gen.* 32:314-331.

Caja, G., R. Nehring, and C. Conill. 2000. Identifying livestock with passive transponders. *Meat Automation* 1:18-21.

Chávez, R., R. Felmer, A. Catrileo, B. Sagredo, S. Iraira, y C. Folch. 2004. Evaluación de microsatélites bovinos para la implementación de un sistema de trazabilidad molecular de la carne bovina. p. 151-152. *In XXIX Reunión Anual de SOCHIPA*, Villarrica. 13-15 de octubre 2004. Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Temuco, Chile.

Conill, C., G. Caja, R. Nehring, and R. Ribó. 2002. The use of passive injectable transponders in fattening lambs from birth to slaughter: Effects of injection position, age, and breed. *J. Anim. Sci.* 80:919-925.

Council of the European Communities. 2000. Regulation (EC) No. 1760/2000 of the European Parliament and of the Council of 17 July 2000 establishing a system for the identification and registration of bovine animals and regarding the labeling of beef and beef products and repealing Council Regulations (EC) No. 820/97. *Off. J. Eur. Communities L204*:1-10.

Cunningham, E., and C. Meghen. 2001. Biological identification systems: genetic markers. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:491-499.

Felmer, R., R. Chávez, A. Catrileo, y C. Rojas. 2006. Tecnologías actuales y emergentes para la identificación animal y su aplicación en la trazabilidad animal. *Arch. Med. Vet.* 38:197-206.

Fernández, R. 2002. Trazabilidad alimentaria. Una herramienta decisiva para la seguridad y la protección de los consumidores. *Distribución y Consumo* N° 62 (Marzo.abril). p. 5-10.

Folch, C., B. Sagredo, S. Iraira, R. Felmer, A. Catrileo, y R. Chávez. 2004. Avances en el desarrollo de un método de identificación molecular para evaluar la trazabilidad en una planta de procesamiento de carne bovina de la X Región de Chile. p. 153-154. *In XXIX Reunión Anual de SOCHIPA*, Villarrica. 13-15 de octubre 2004. Sociedad Chilena de Producción Animal (SOCHIPA), Temuco, Chile.

Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Darnell. 1995. *Molecular cell biology*. 1344 p. 3rd ed. Scientific American Books, New York, USA.

Masahiko, S., O. Yamakita, H. Shin-ichi, K. Yuji, A. Hiroko, S. Naoki, and K. Ryo. 2001. A horse identification system using biometrics. *Syst. Comput. Jpn.* 32:12-23.

Mathias, M., B. Sagredo, and J. Kalazich. 2007. Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. *Agríc. Téc. (Chile)* 67:3-15.

Mujica, F. 2005. Diversidad, conservación y utilización de los recursos genéticos animales en Chile. *Boletín INIA* N°137. 124 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Remehue, Osorno, Chile.

Panaccio, M., and A. Lew. 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res.* 19:1151.

Ribó, O., C. Korn, U. Meloni, M. Cropper, P. De Winne, and M. Cuype. 2001. IDEA: a large-scale project on electronic identification of livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20:426-436.

SAG. 2006. Procedimientos generales del Programa Oficial de Trazabilidad Sanitaria Animal. Disponible en <http://www.trazabilidad.sag.gob.cl> (Leído octubre 2006).

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463-6471.

Tessier, C., J. David, P. This, J.M. Boursiquot, and A. Charrier. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98:171-177.

Vázquez, F., T. Pérez, F. Ureña, E. Gudín, J. Albornoz, and A. Domínguez. 2004. Practical application of DNA fingerprinting to trace beef. *J. Food Prot.* 67:972-979.

Visscher, P.M., J. Woolliams, D. Smith, and J. Williams. 2002. Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. *J. Dairy Sci.* 85:2368-75.

Zamora, M., R. Ginés, J.M. Afonso, M. Reig, L. García, y J. Zamorano. 2004. Caracterización genética de la raza bovina Canaria utilizando microsatélites: Estudio preliminar. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 12:12-15.

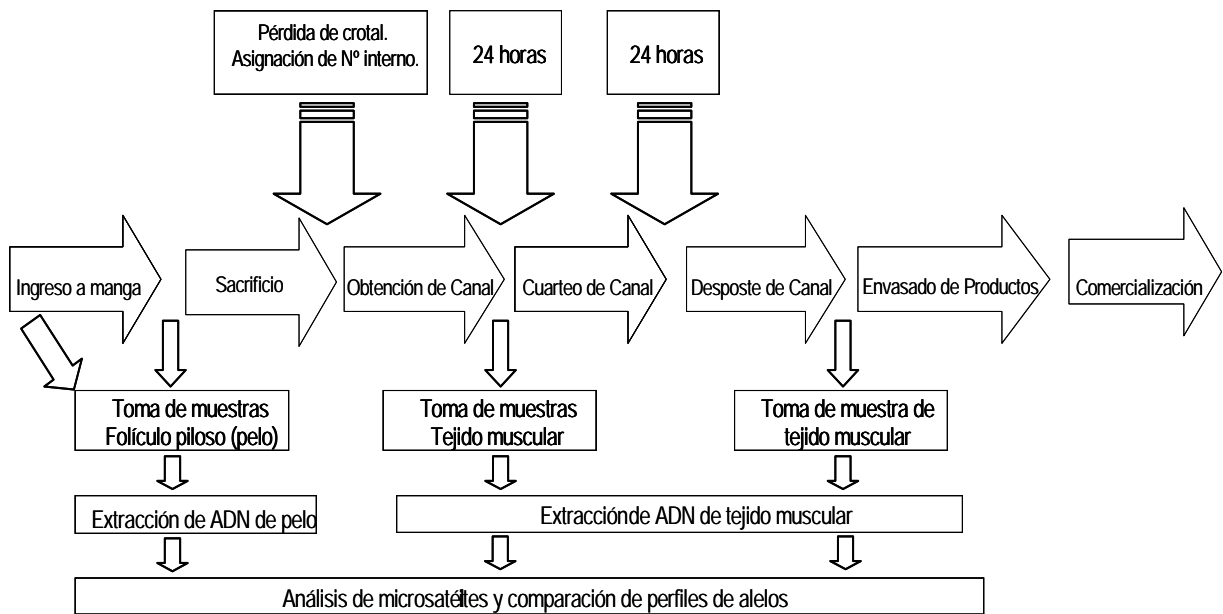


Figura 1. Diagrama de flujo de una planta de procesamiento de carne y detalles de la toma y análisis de muestras.

Figure 1. Flow chart of a meat processing plant and details of sampling and analysis.

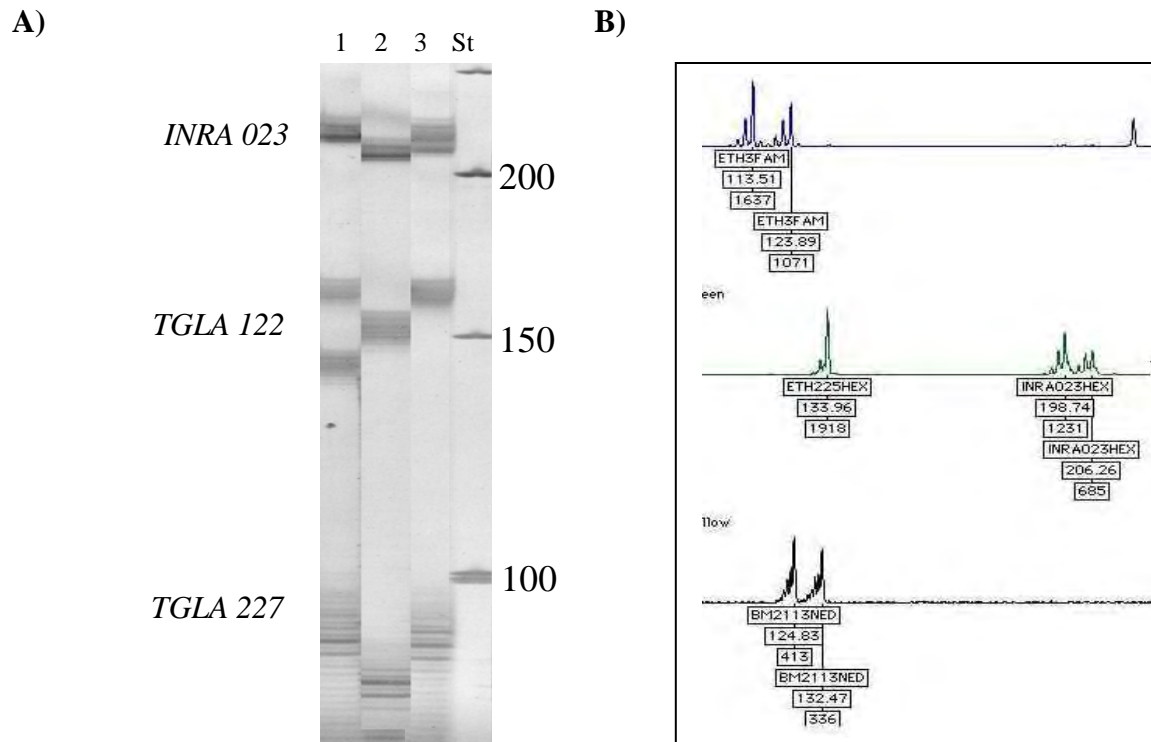


Figura 2. Fragmentos de ADN obtenidos por medio de reacciones múltiplex de PCR. A) Análisis de fragmentos de tres muestras de animales (1-3) mediante el sistema de geles de poliacrilamida, empleando los marcadores moleculares INRA 023, TGLA 122 y TGLA 227; St: estándar de tamaño molecular. B) Análisis de fragmentos de una muestra de tejido mediante el sistema de electroforesis capilar empleando los marcadores moleculares ETH3, ETH225, INRA23 y BM2113.

Figure 2. DNA fragments obtained by means of multiplex PCR reactions. A) Fragment analysis of three animal samples (1-3) separated by means of silver stained polyacrilamide gel, using molecular markers INRA 023, TGLA 122 and TGLA 227; ST: molecular size standard. B) Fragment analysis of a tissue sample by means of their fluorescence with an automatic sequencing machine using molecular markers ETH3, ETH225, INRA23 and BM2113.

Cuadro 1. Características de la toma de muestra y almacenamiento de las distintas muestras biológicas evaluadas.

Table 1. Characteristics of the sampling and storage of different biological samples assessed.

Muestra	Toma de muestra	Almacenamiento	Observaciones
Pelo	-Utilizar alicates de punta plana. -Sacar pelos del lomo del animal. -Tirar a contra pelo. -Obtener folículos pilosos visibles.	-4 °C o temperatura ambiente.	Utilizar pelos negros o blancos (evitar el uso de pelos rojos-café). Secar si están húmedos a 37 °C por 24 h.
Biopsias	-Sacar con sacabocado desde la oreja.	-4 °C si se va a usar inmediatamente, de lo contrario, mantener a -20 °C.	Requiere de un sacabocado especial tipo Biopsytec.
Sangre	-Utilizar EDTA como anticoagulante. -Obtener por punción coccígea. -Agitar la muestra inmediatamente.	-4 ó -20 °C.	Se debe evitar la hemólisis.
Contramuestra	-Obtener de la canal madura en el frigorífico desde algún músculo de fácil acceso. Se puede utilizar sistema de sacabocado para obtener un trozo de tejido.	-20 °C.	Se debe solicitar planilla de producción en vara.

Cuadro 2. Análisis de microsatélites mediante reacciones múltiplex a partir de distintas muestras biológicas de un mismo animal.

Table 2. Analysis of microsatellites by means of multiplex reactions from different biological samples from the same animal.

		Multiplex 1				Multiplex 2			Multiplex 3		
Muestra		ETH3	TGLA122	TGLA227	BM1824	ETH10	ETH225	BM2113	INRA23	SPS115	TGLA126
1	P	114 118	140 148	83 91	180 182	214 216	138 144	128 134	198 212	242	125
	B	114 118	140 148	83 91	180 182	214 216	138 144	128 134	198 212	242	125
	C	114 118	140 148	83 91	180 182	214 216	138 144	128 134	198 212	242	125
	S	114 118	140 148	83 91	180 182	214 216	138 144	128 134	198 212	242	125
2	P	116 124	140 160	n.c.	180 182	216 222	142 144	130 134	n.c. n.c.	248	117 125
	B	116 124	140 160	93	180 182	216 222	142 144	130 134	198 206	248	117 125
	C	116 124	140 160	93	180 182	216 222	142 144	130 134	198 206	248	117 125
	S	116 124	140 160	93	180 182	216 222	142 144	130 134	198 206	248	117 125
3	P	114	146	81 93	180 188	214 216	144	130	200 206	242 246	117
	B	114	146	81 93	180 188	214 216	144	130	200 206	242 246	117
	C	114	146	81 93	180 188	214 216	144	130	200 206	242 246	117
	S	114	146	81 93	180 188	214 216	144	130	200 206	242 246	117

P: pelo, B: biopsia de la oreja, C: trozo de carne de la canal, y S: sangre; n.c.: no considerada. Se refiere a muestras que no amplificaron o cuyos productos de amplificación no pudieron ser leídos correctamente por el secuenciador.

Cuadro 3. Número de alelos, contenido de información polimórfica (PIC) y poder de discriminación de los 10 microsatélites analizados en un grupo de animales de las razas overo negro (n = 52) y overo colorado (n = 63).

Table 3. Allele number, polymorphic information content (PIC) and discrimination power of each one of the 10 microsatellites analysed in a group of animals from overo negro (n = 52) and overo colorado (n = 63) breeds.

Marcador	Crom	Alelos N°		Rango tamaño (pb)	PIC		Poder discriminatorio de SSR											
							Observado					Esperado						
		Co			Do		Xo		Cj		Dj		Xj					
		ON	OC		ON	OC	ON	OC	ON	OC	ON	OC	ON	OC	ON	OC		
ETH3	19	7	6	105-125	0,703	0,795	0,075	0,051	0,925	0,949	157	100	0,283	0,192	0,717	0,808	375	375
ETH225	9	7	6	133-145	0,738	0,800	0,129	0,088	0,871	0,912	143	171	0,248	0,187	0,752	0,813	329	365
BM1824	1	4	4	178-188	0,622	0,642	0,243	0,165	0,757	0,835	236	322	0,366	0,348	0,634	0,652	485	680
BM2113	2	6	6	122-136	0,795	0,813	0,076	0,052	0,924	0,948	99	101	0,190	0,174	0,810	0,826	251	340
INRA23	3	8	6	196-212	0,813	0,789	0,091	0,062	0,909	0,938	78	121	0,171	0,199	0,829	0,801	227	388
SPS115	15	6	4	242-256	0,452	0,580	0,308	0,209	0,692	0,791	473	408	0,539	0,411	0,461	0,589	715	802
TGLA126	20	5	5	116-124	0,482	0,744	0,207	0,141	0,793	0,859	405	275	0,509	0,244	0,491	0,756	675	476
TGLA122	21	8	12	138-186	0,761	0,846	0,041	0,028	0,959	0,972	104	55	0,224	0,141	0,776	0,859	297	274
ETH10	5	8	6	209-223	0,834	0,716	0,137	0,093	0,863	0,907	45	182	0,150	0,272	0,850	0,728	199	531
TGLA227	18	9	8	77-99	0,794	0,837	0,085	0,058	0,915	0,942	91	113	0,190	0,150	0,810	0,850	252	293

SSR: simple sequence repeats; Crom: cromosoma; ON: overo negro; OC: overo colorado; PIC: Contenido de información polimórfica; Co: probabilidad observada de confundir genotipos; Do: poder de discriminación observado; Xo: número de pares observado de genotipos no diferenciados dentro de una muestra; Cj: probabilidad esperada de confundir genotipos; Dj: poder de discriminación esperado; Xj: número de pares esperado de genotipos no diferenciados dentro de una muestra.

Cuadro 4. Análisis de la trazabilidad de seis animales en una planta de procesamiento de carne.

Table 4. Analysis of the traceability of six animals in a meat processing plant.

Muestra		Múltiplex 1				Múltiplex 2			Múltiplex 3		
		ETH3	TGLA122	TGLA227	BM1824	ETH10	ETH225	BM2113	INRA23	SPS115	TGLA126
1	P	123	140	81	181	211	133	124	201	252	121
			152	99	183	215	141	128	207	256	
1	C	123	140	81	181	211	133	124	201	252	121
			152	99	183	215	141	128	207	256	
2	P	113	140	99	181	213	141	122	205	256	121
		121	172		183	215	124	215			
2	C	113	140	99	181	213	141	122	205	256	121
		121	172		183	215	124	215			
3	P	113	174	nc	183	213	141	122	nc	248	121
		117	182			215	143	132		252	
3	C	113	174	99	183	213	141	122	209	248	121
		117	182			215	143	132		252	
4	P	115	154	nc	183	215	141	130	201	256	121
			162		189		143	134	215		
4	C	115	154	93	183	215	141	130	201	256	121
			162	99	189		143	134	215		
5	P	113	148	81	181	213	133	130	199	248	121
			152	99	191		141	134	207	252	
5	C	113	148	81	181	213	133	130	199	248	121
			152	99	191		141	134	207	252	
6	P	113	140	81	189	215	133	124	207	248	121
			148	99	191			134		252	
6	C	113	140	81	189	215	133	124	207	248	121
			148	99	191			134		252	

P: pelo; C: canal; nc: no considerada.