

FoodReady® COT

Detección de ADN de Codorniz (*Coturnix coturnix*) por PCR a tiempo real

Introducción

La autenticación de alimentos está adquiriendo cada vez más importancia debido a la exigencia de etiquetados más precisos y confiables. En particular, en el caso de productos cárnicos, los consumidores quieren protegerse de alimentos mal etiquetados que puedan contener carnes de otras especies no indicadas o desconocidas. La aplicación de métodos desarrollados específicamente para detectar estas desviaciones debe facilitar la determinación de especies adulterantes no declaradas, lo que ayudará a proteger del fraude tanto a los consumidores como a los productores a la vez que permite detectar la venta ilegal de especies protegidas. La carne de aves de caza y los productos derivados a menudo son objeto de etiquetados fraudulentos debido al elevado valor comercial asociado a los mismos.

FoodReady COT es un kit basado en PCR a tiempo real con sonda de hidrólisis que permite la detección de ADN de codorniz con finalidades forenses, principalmente en la detección de adulteración de alimentos y derivados cárnicos o simplemente para la autenticación de la misma.

Presentación

FoodReady COT se presenta en una caja que contiene una pre-mix con todos los reactivos necesarios para 48 o 96 reacciones. La pre-mix incluye un control interno de amplificación (IAC) que ayuda a controlar los falsos negativos (véase tabla 2)

- Pre-mix: Test de ADN de codorniz con control interno de amplificación (IAC)
- Control positivo: ADN estabilizado de *Coturnix coturnix*
- H₂O de grado Biología Molecular (libre de DNAasas)

Especificaciones técnicas

FoodReady COT es un kit basado en el uso de sondas de hidrólisis fluorescentes para su uso en la detección de la presencia de ADN de codorniz en productos alimentarios. Puede usarse para cuantificar en un rango lineal de 20 ng/μl a 20 pg/μl. Los cebadores amplifican una región del ADN mitocondrial específica de esta especie. El amplicón (104 pb) es suficientemente corto para permitir la detección de ADN deteriorado o troceado por procesados agresivos del alimento.

Sensibilidad: 20 pg/μl de ADN genómico

Especificidad: Positivo para codorniz (*Coturnix coturnix*) en todas sus variedades y razas. No se ha observado reacción cruzada con otros animales o plantas.

Límite de detección: Nivel de detección relativo: 0.1 % (ver más adelante)

Uso

Extracción y purificación de DNA

Existen varios kits comerciales con un buen rendimiento de ADN a partir de 20-200 mg de producto.

Se recomienda una concentración final de 10 ng/μl a 50 ng/μl. El límite de detección del 0,1% se consigue con extractos con concentraciones de ADN ≥ 20 ng/μl.

PCR

Para cada analítica, preparar tantos tubos como muestras a analizar y 2 tubos adicionales para controles (positivo y negativo) y añadir 15 μl de la pre-mix FoodReady COT. Cargar la PCR con 5 μl del extracto de ADN o del control positivo incluido en el kit. Realizar una dilución 1/10 del extracto de la muestra si se observa inhibición (véase tabla de interpretación de resultados). Para controlar la contaminación cruzada durante la extracción de ADN, en especial cuando se procesa simultáneamente un elevado número de muestras, se recomienda realizar un control negativo de extracción. Amplificar según condiciones recogidas en la tabla 1.

Tabla 1. Programa del termociclador

Ciclos	Evento	Temperatura	Tiempo
1	Activación de la polimerasa (Hot Start)	95 °C	10 minutos
45	Desnaturalización	95 °C	15 segundos
	Hibridación ✎	52 °C	30 segundos
	Extensión	72 °C	30 segundos

✎ = lectura de fluorescencia: **CY5** (canal del rojo) para el detector de ADN de codorniz; **HEX** (canal del amarillo-naranja) para el detector del IAC

Interpretación de resultados.

Una reacción se considera positiva siempre que se produzca una curva de amplificación para ADN de codorniz y ésta cruce el valor umbral definido por el control positivo. Solamente se considera negativo un resultado cuando no hay amplificación en el canal del CY5 y sí la hay para el IAC (HEX)

Tabla 2. Interpretación de resultados

CY5 (codorniz)	HEX (IAC)	Resultado	Comentario
+	+ o -	Positivo	La amplificación de IAC puede anularse por competencia ante una gran cantidad de ADN de codorniz.
-	+	Negativo	
-	-	Inhibición	Diluir o purificar el extracto de ADN

Límite de detección

La sensibilidad de este sistema de PCR a tiempo real es de 20 ng/µl, esto es, 100 ng de ADN de codorniz por reacción. Por tanto, se consigue un límite de detección (LD) del método del 0,1% con extractos que contengan ≥ 20 ng/µl de ADN total. Si se obtienen rendimientos menores de ADN de la muestra, el límite de detección que se incluye en el informe, variará de acuerdo a los valores expresados en la tabla 3.

Tabla 3. Límite de detección en función de la concentración de ADN del extracto

[ADN] extracto	ADN/reacción	LD
≥ 20 ng/µl	100 ng	0,10%
15 ng/µl	75 ng	0,13%
10 ng/µl	50 ng	0,20%
5 ng/µl	25 ng	0,40%

Expresión de resultados

En muestras compuestas, preparados alimentarios, piensos, etc, los resultados pueden expresarse como detectado/no detectado en la muestra (refiriendo el LD indicado en la tabla anterior) o cuantitativamente como porcentaje de ADN de codorniz respecto al ADN total extraído de la muestra.

Cuando el kit se use para autenticación de especies un resultado positivo se informará como identificación positiva de codorniz.

Conservación y almacenaje

A la recepción del kit, guardar a -20 °C. Si se va a usar frecuentemente, puede conservarse en el refrigerador a 4 °C para evitar ciclos repetidos de descongelación.

Nota importante: La fragmentación o degradación extrema del ADN debido a procesados agresivos del alimento, puede producir falsos negativos.