

# FoodReady® LEP-R

## Detección de ADN de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) por PCR a tiempo real

---

### Introducción

El uso de proteínas animales procesada para alimentar animales estabulados para producción de carne está prohibida por la Unión Europea (EC Council, 2001) y la Regulación 2002/774/EC 8EC Council 2002) impone la prohibición de alimentar animales con proteínas de la misma especie. Además, para reforzar medidas de control en la autenticación de carne, la autoridad legislativa establece que los productos cárnicos deben estar correctamente etiquetados en lo referente a la composición de especies.

Junto a los aspectos regulatorios, la identificación de las especies presentes en los alimentos ha adquirido una gran importancia recientemente en la evaluación de la composición de los alimentos, para proporcionar a los consumidores información precisa sobre los productos que compran. La creciente demanda de transparencia en la industria alimentaria ha impulsado el desarrollo de métodos para el análisis de los ingredientes alimentarios. De todos los disponibles, el análisis de ADN mediante PCR ofrece los mejores resultados, incluso sobre productos procesados y, por tanto, las mayores garantías,

FoodReady LEP-R es un kit basado en PCR a tiempo real con sonda de hidrólisis que permite la detección de ADN de conejo con finalidades forenses, principalmente en la detección de adulteración de alimentos y derivados cárnicos.

### Presentación

FoodReady LEP-R 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 conejo con control interno de amplificación (IAC)
- Control positivo: ADN estabilizado de *Oryctolagus cuniculus*
- H<sub>2</sub>O de grado Biología Molecular (libre de DNAasas)

### Especificaciones técnicas

FoodReady LEP-R es un kit basado en el uso de sondas de hidrólisis fluorescentes para su uso en la detección de la presencia de ADN de conejo 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 gen de la Beta-Actina porcina, una proteína globular multifuncional que forma microfilamentos y que se halla en prácticamente todas las células eucariotas. El amplicón (104 pb) es suficientemente corto para permitir la detección de ADN deteriorado o troceado por procesados agresivos del alimento.

<i>Sensibilidad:</i>	20 pg/μl de ADN genómico
<i>Especificidad:</i>	Positivo para conejo ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) en todas sus variedades y razas. No se ha observado reacción cruzada con otros animales o plantas.
<i>Limite of detección:</i>	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 LEP-R. 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
40	Desnaturalización	95 °C	15 segundos
	Hibridación ✎	51 °C	30 segundos
	Extensión	72 °C	30 segundos

✎ = lectura de fluorescencia: **CY5** (canal del rojo) para el detector de ADN de conejo; **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 conejo 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 HEX y sí la hay para el IAC (CY5)

Tabla 2. Interpretación de resultados

CY5 (conejo)	HEX (IAC)	Resultado	Comentario
+	+ o -	Positivo	La amplificación de IAC puede anularse por competencia ante una gran cantidad de ADN de conejo.
-	+	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 AND de conejo 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 conejo.

#### 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 en presencia de carne de conejo o derivados.