

Análisis de filiación para certificar la pureza de la raza

Resumen: En la actualidad, el uso de técnicas en biología molecular para el control alimentario esta a la orden del día. La inclusión de estudios genéticos para la trazabilidad de canal, control de libros genealógicos, detección de enfermedades, identificación de caracteres productivos, entre otras cosas, ya son una realidad. Desde hace años el Laboratorio NASERTIC lleva desarrollando y realizando diferentes técnicas para realizar este tipo de estudios. Desde 2016 el laboratorio NASERTIC colabora con La Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto (FEAGAS), y entre ellas AECERIBER, para dar servicio en su control del libro genealógico mediante identificación genética.

Palabras clave: Laboratorio, perfil genético, filiación, NASERTIC, identificación

María Dolores López Rota
Susana Pedrosa Moro
Mariola Elia López
Jesús Lacalle Valencia
Toya Bernad

NASERTIC

CONTEXTO

La Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto (FEAGAS) y NASERTIC suscribieron en junio de 2016 un acuerdo de colaboración para la realización de las pruebas de genotipado para filiación en bovino, equino y porcino.

Actualmente, un total de veinte organizaciones miembros de FEAGAS, entre ellas AECERIBER, están trabajando con el Laboratorio de NASERTIC bajo las ventajosas condiciones económicas y de gestión pactadas por ambas partes en la negociación previa a la firma del mencionado convenio.

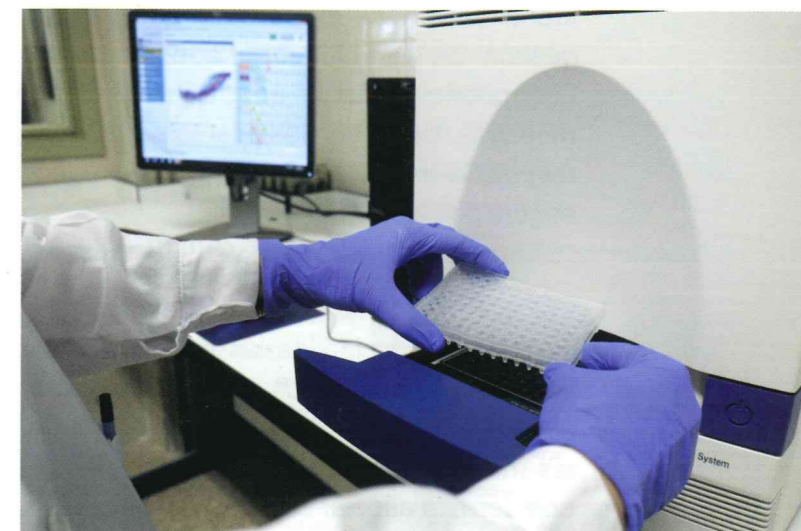
En este artículo informaremos de toda la **cadena de valor**

científico tecnológica del Laboratorio de NASERTIC para la realización de la analítica requerida para los Libros Genealógicos de las Asociaciones de FEAGAS, referentes a nivel nacional e internacional, como AECERIBER.

Los Libros Genealógicos de las Razas Domésticas nacieron con la intención de garantizar la pureza racial y verificar las genealogías de las razas de las diversas especies domésticas. Constituyen un instrumento esencial no sólo en los programas de conservación, especialmente en aquellas razas con una implantación local o regional, sino también en los de mejora o selección genética.

El Libro Genealógico para la Raza Porcina Ibérica nació en 1987, por Orden de 28 de mayo de

1987 (BOE 30/05/1987) mediante la cual se aprobó su reglamentación específica. El MAPA, por Orden de 30 de julio de 1987 concede el título de Entidad Colaboradora a AECERIBER, que pasa así a gestionar el Libro prácticamente desde su nacimiento. La entrada de España en la UE trajo consigo el reconocimiento de AECERIBER como Asociación de Raza Pura, publicado en el Real Decreto 723 de 8 de junio de 1990 y en la Orden Ministerial de 22 de Julio de 1991, con la Resolución de 11 de mayo de 1993. La finalidad de AECERIBER es, como no podía ser otra, la certificación de la Pureza Racial de los ejemplares reproductores inscritos.



Con el fin de certificar la inscripción en el Libro Genealógico de la raza y/o estirpe, una vez que por distintas vías ha podido ser acotada la población de animales pertenecientes a una determinada raza y/o estirpe, un análisis genético "simple" permite comprobar la genealogía de los nuevos animales. Con esta comprobación imprescindible, se dispone de la información suficiente para su registro en dicho Libro.

El estudio genético se realiza a partir del análisis de marcadores genéticos tipo STRs o microsatélites. Al tratarse de ADN nuclear, estos análisis podrán llevarse a cabo a partir de cualquier muestra de tejido, o fluido biológico que contenga células del animal.

El Laboratorio de NASERTIC dispone de distintos procedimientos que permiten extraer ADN de los distintos tejidos o fluidos. La amplificación y análisis de este ADN unido a los resultados genéticos ya disponibles para otras muestras permitirá realizar trabajos de identificación, filiación y exclusión de parentesco.

El fundamento técnico del análisis genético utilizado para los estudios genéticos citados en el párrafo anterior consiste en establecer una identificación genética del animal (perfil genético) a partir del análisis de aproximadamente 20 marcadores distribuidos a lo largo de su genoma. Las relaciones de filiación se establecen en función de la herencia del mismo (50% de la madre y 50% del padre).

A) Identificación y trazabilidad analítica

Los desarrollos técnicos han hecho que los análisis genéticos a día de hoy sean muy accesibles en todos los aspectos, lo que ha provocado un importante incremento en la demanda tanto para identificación genética humana como animal. El volumen de muestras que analizamos en el Laboratorio de NASERTIC va creciendo de manera exponencial resultando de vital importancia disponer de un sistema que permita procesar grandes cantidades de muestras así como garantizar la identificación y trazabilidad de las muestras desde su llegada al Laboratorio hasta la obtención del perfil genético final. La sistemática de



identificación debe permitir una rápida gestión de las muestras que facilite al Laboratorio gestionar un gran número de muestras. Estos son los pilares para dar la respuesta analítica de la forma más ágil y segura posible.

Por lo tanto, es de suma importancia la identificación de las matrices y los soportes en los que las muestras vayan a ser enviadas al Laboratorio. Cada una de las muestras debe tener un código único que permita asociar este a la identificación única del animal del que se ha tomado. Esta es la sistemática que permitirá trazar la identificación del animal con el objeto del estudio genético.

Desde el Laboratorio NASERTIC se requiere que las muestras dispongan de algún sistema de codificación (código de barras o código bidi) que permita ser leído con equipos electrónicos como escáner de mano. Esta sistemática de lectura junto con el software de gestión garantizará la trazabilidad de la muestra y los trabajos realizados sobre la misma durante su paso por el Laboratorio.

Toma de muestras

Los tejidos y/o fluidos biológicos que llegan al Laboratorio contienen una cantidad de células variable, dependiendo de factores como la toma de muestra o las condiciones de conservación.

Para optimizar la gestión de los libros genealógicos la sistemática de trabajo recomendada es realizar la toma de muestras de manera simultánea a la identificación individual del animal. En el momento de identificación se asocia esta con el código de la muestra enviada al

Laboratorio.

Los tejidos o fluidos más comunes de los que se pueden obtener células para la extracción de ADN nuclear son:

Sangre: Actualmente la forma más común de obtención de muestra. La principal ventaja de esta matriz es que con un tubo se dispone de una elevada cantidad de muestra así como la facilidad de manejo en Laboratorio mediante procesos automatizados. La desventaja de este tipo de muestra es que la toma de muestras debe ser realizada por técnicos cualificados. Los tubos que permiten conservar la sangre y extraer ADN en cantidad y calidad suficiente para la obtención del perfil genético son dos tipos:

- EDTA – Tapa morada: La muestra contiene una concentración de sales baja que facilita una mejor extracción del ADN. La conservación debe ser en refrigeración o congelación.

- Magic Buffer – Tapa gris: La conservación puede ser a temperatura ambiente. Las muestras contienen una elevada concentración de sales que dificulta la extracción, sobre todo en los casos en que la cantidad de sangre del tubo sea pequeña o que la conservación se produzca a temperaturas extremas (menos de 8°C o más de 30°C). (indicar que se necesita un volumen mínimo de muestra para garantizar un resultado fiable).

Tejido: Matriz cada vez más utilizado el envío de pabellón auricular,



ya que la obtención de la muestra se da sin trabajo adicional alguno a lo que supone la identificación del animal, no requiere ser realizado por técnicos con una cualificación específica y la trazabilidad de las muestras al animal del que han sido tomadas es muy sencilla.

Las desventajas que esta matriz presenta es el reducido tamaño de la muestra, el coste de los soportes de muestra es superior al de las muestras de sangre, las muestras son procesadas en su totalidad y no queda reservorio de muestra y si por cualquier cuestión no se puede obtener perfil genético debe volver a realizarse la toma de muestra.

Por la experiencia adquirida con el trabajo en los distintos soportes de muestra, desde el Laboratorio se recomienda, antes de decantarse por cualquier opción comercial, realizar unas pruebas para comprobar que a partir de la combinación entre la muestra y el soporte utilizado se puede obtener ADN de calidad suficiente para la obtención de un correcto perfil genético.

Pelo: La principal ventaja que presenta esta matriz es la facilidad de obtención de la muestra, aunque también cuenta con notables inconvenientes, siendo el más importante la posibilidad de que la muestra no sea válida por falta de raíz (foliculo piloso), ya que ésta es la única parte del pelo que contiene células y por tanto la única de la que poder extraer ADN nuclear. La peculiaridad de la muestra hace que se incremente de forma notoria la facilidad de contaminación

cruzada entre muestras. Por último, los procedimientos de trabajo con esta matriz en el Laboratorio son más complejos que con las otras matrices expuestas, por lo que el coste analítico se incrementa también respecto de las otras matrices.

Células bucales – Frotis bucal:

Este tipo de muestra, en algunas ocasiones definida como muestra de saliva, no se considera apropiada ya que si la boca no está limpia (algo habitual en los animales) la presencia de distintos compuestos puede interferir en la calidad de los procesos, ya sea por la presencia de otros tipos de ADN o de sustancias que inhiban la extracción o amplificación del ADN.

Competencia científica tecnológica avalada

Con todo lo expuesto anteriormente, se muestra que el Laboratorio de NASERTIC dispone de la capacidad para procesar distintos tipos de muestras y para todas ellas el requisito en común es que dispongan de identificación electrónica única. Esta identificación de las muestras unida a la identificación del animal, que también debe ser única, facilitará el poder realizar de la forma más automatizada posible la gestión de las muestras.

La comunicación e intercambio de información entre las distintas asociaciones y el Laboratorio puede realizarse a través de dos vías distintas:

-**PERFILAN**, aplicación web en la que los clientes disponen de códigos de acceso para poder cargar toda la información necesaria para la gestión



Unimos información y tecnología

de las muestras (explotaciones, animales, muestras, etc.) así como descargar los resultados e informes generados desde el Laboratorio. Esta plataforma apenas requiere dedicación inicial de recursos ya que el intercambio de información es a través de ficheros con unos determinados formatos, que pueden ser creados manualmente a partir de una hoja de cálculo o una base de datos.

- **Web Service:** Desarrollos hechos a medida que comunican la plataforma de trabajo del Laboratorio y el sistema de gestión de cada asociación. Conlleva un elevado coste inicial de programación informática. Una vez desarrollado se minimizan de manera notable tanto los recursos requeridos para la gestión diaria como las incidencias.

Otro de los valores añadidos que aporta el Laboratorio de NASERTIC a las Asociaciones de FEAGAS, entre ellas a AECERIBER, es el Sistema de Gestión de Calidad. Los procedimientos de trabajo y

control de calidad de NASERTIC están desarrollados cumpliendo los requisitos de la norma UNE EN ISO/IEC 17025. Esta sistemática permite al Laboratorio estar acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación para el análisis de marcadores moleculares tipo microsatélites para la identificación y análisis de filiaciones animales. Los informes emitidos por el Laboratorio NASERTIC son certificados reconocidos a nivel mundial y con total garantía para posibles procesos judiciales en los que estos informes puedan ser aportados como pruebas periciales.

Disponer de un alcance de acreditación abierto, disponiendo de Lista de Ensayos Bajo Acreditación (LEBA) obliga a nuestro Laboratorio a disponer de procedimientos de validación de métodos analíticos de manera rápida y ágil.

La acreditación con alcance abierto permite además satisfacer de manera inmediata nuevas necesidades de cliente e informar, amparados con el sello de la acreditación, nuevos ensayos sin necesidad de procesos que se alargan en el tiempo por la necesidad de intercambio de información así como de auditorías presenciales.

B) Inicio del proceso analítico

Lo expuesto en los apartados anteriores permite gestionar las muestras de una forma ágil y segura, garantizando en todo momento la trazabilidad de las mismas desde el momento de su llegada, que es cuando se verifica y se contrasta toda la información recibida y se genera la correspondiente solicitud.



Extracción de ADN en el Laboratorio de NASERTIC

1. Extracción de ADN:

La extracción se realiza mediante procedimientos que permiten obtener ADN de muestras de distinta naturaleza de forma automatizada. La mayor parte de las muestras recibidas son de sangre (tubos con conservante EDTA o Magic Buffer) o de tejido (pabellón auricular). El Laboratorio de NASERTIC utiliza placas donde se extrae el ADN de hasta 95 muestras gracias a un robot de pipeteo y un equipo de extracción automática). El ADN resultante se conserva en refrigeración o congelado.

2. Amplificación del ADN y Electroforesis en secuenciador automático:

Amplificación de los marcadores genéticos mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y la detección de los mismos mediante la electroforesis en un secuenciador automático.

Estas secuencias de tipo microsatélite están constituidas por motivos

básicos que se repiten en tándem "n" veces y son altamente variables entre individuos, así pues, para cada marcador microsatélite en los distintos individuos encontraremos distintas variantes o alelos. Cada individuo presenta una combinación de alelos exclusiva que da lugar a su huella genética. Como la información genética contenida en el ADN es heredada de los padres a su descendencia, es posible contrastar la huella genética de un individuo con la de sus progenitores.

Realizamos la identificación genética mediante la determinación del número de repeticiones (alelos) de un panel de 17 marcadores microsatélites del ADN, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) que establece los microsatélites más adecuados para la identificación y filiación para las diferentes especies. Analizar simultáneamente un alto número de marcadores posibilita poder analizar y discriminar las relaciones de filiación en grupos de animales donde existe un alto grado de consanguinidad. Permite además llevar a cabo exclusiones



Técnicas de Biología Molecular de NASERTIC secuenciando ADN

de paternidad con datos procedentes de otros Laboratorios en los que se utilicen algunos de los marcadores incluidos en este panel. La posibilidad de comparar estos marcadores obtenidos en otros Laboratorios es posible gracias al hecho de que nuestros 17 marcadores estén seleccionados de las listas de la ISAG, que presentan una nomenclatura estandarizada.

3. Obtención de perfiles:

Cada uno de los 17 marcadores microsatélite que componen el perfil genético está compuesto de 2 alelos o variantes (uno heredado de la madre y otro del padre, a veces es el mismo). La combinación de estos alelos genera una huella genética exclusiva de cada individuo. El perfil de cada animal no varía con el tiempo ni en los distintos tejidos o fluidos del animal. Una vez obtenidos, estos datos quedan almacenados en el sistema de modo que pueden ser utilizados en las pruebas de filiación que el cliente solicite incluso después de la muerte del animal.

La calidad del perfil obtenido variara mucho dependiendo de varios factores entre los que el más importante es

la calidad de la muestra (conservante utilizado, temperatura de conservación, tiempo hasta la entrega en el Laboratorio, fluido o tejido de elección, etc.).

4. Estudios de comparación:

Una vez obtenido el perfil genético se puede verificar el parentesco o identificar al animal a diferentes niveles:

1. Estudios de identidad: identificación de animales a partir de su perfil genético, verificar la identidad de un animal mediante la comparación con el perfil genético de una muestra tomada con anterioridad. El perfil genético de un individuo se mantiene inalterable durante toda la vida del animal, si comparamos los perfiles genéticos de dos muestras tomadas del mismo animal en distintos momentos, estos han de ser idénticos.

2. Estudios de filiación: comparación de los perfiles genéticos de distintos individuos para determinar su compatibilidad o excluirla, es decir, determinar si el genotipo del hijo es compatible o incompatible con el de sus progenitores. Los marcadores moleculares que conforman el perfil genético presentaran dos versiones o alelos, uno heredado del padre y otro de la madre biológica. Así para cada marcador la información que tiene el hijo tiene que proceder del padre y la madre al 50%. Encontrar alelos en el presunto hijo que no han podido ser transmitidos por la madre o por el padre implica que estos son incompatibles y podemos excluir la relación de filiación. Podemos encontrarnos diferentes casos entre las solicitudes del cliente:

- compatibilidad con los dos padres
- compatibilidad con uno de los padres
- búsqueda de padres entre un lote de animales
- exclusión de la paternidad.

El tipo de comparación que nos soliciten dependerá mucho del sistema de cría y del registro reproductivo que lleve la explotación; un buen control en la explotación reducirá al mínimo las posibilidades de búsqueda sobre las cuales efectuar la prueba.

En el mejor de los casos las asociaciones solicitan estudios de filiación dirigidos, es decir, se pretende determinar si un individuo es hijo de una madre y un padre dados. En los casos en los que se trata de encontrar el padre de un individuo entre un grupo de sementales, se determina cual es el padre más probable excluyendo los otros, y normalmente fijando a la madre. Y en el peor de los casos se solicita hacer el estudio de filiación solamente con uno de los parentales.

La declaración de incompatibilidad entre un padre y un hijo tiene una certeza absoluta, del cien por cien. Sin embargo, la asignación de paternidad tiene asignada una probabilidad que depende del número de marcadores empleados para el estudio y la frecuencia en la población de estos alelos o variantes del marcador. La precisión de la prueba es cercana al 100% cuando ambos padres están incluidos el estudio y baja considerablemente cuando falta uno de los progenitores.



Obtención de perfiles y estudios de comparación

C) ¿Y qué nos depara el futuro analítico?

El trabajo con marcadores genéticos, además de ser utilizado para estudios de filiación o de trazabilidad, tiene diversas aplicaciones que se pueden implementar de una forma sencilla:

· Estudios de genética poblacional. Establecer los niveles de variabilidad genética que se encuentra en una explotación, raza, etc.

· Asignación de individuos a una raza. Determinar si un individuo concreto pertenece o no a esa raza y/o en qué grado.

· Estudio genético de marcadores que pueden estar ligados a un carácter productivo.

· Estudios genéticos de marcadores que puedan estar ligados a la susceptibilidad o no de padecer una enfermedad.

Actualmente se está avanzando de forma extraordinaria en el uso de nuevas técnicas para el estudio del genoma animal. Cada día, gracias a los secuenciadores de nueva generación, se describen nuevos caracteres implicados en la mejora genética de una raza, especie, etc., abriendo un campo indescriptible a las posibilidades de futuros análisis.

