



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 243**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03719637 .5**
96 Fecha de presentación : **08.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1492805**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

54 Título: **Sistema para rastrear productos animales.**

30 Prioridad: **08.04.2002 US 370870 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2010

73 Titular/es: **Pig Improvement Company UK Limited**
Fyfield Wick
Oxfordshire, Abingdon OX13 5NA, GB

72 Inventor/es: **Plastow, Graham S.;**
Mileham, Alan;
Wilken, Todd;
Gladney, Christy y
Bastiaansen, John

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 343 243 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema para rastrear productos animales.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a un método para identificar de forma única animales con propósitos de recogida, tratamiento de archivos y recuperación de datos de un modo exacto y económico. La identificación y el registro de animales ha sido un motivo de preocupación creciente durante los últimos años. En general, la identificación y el registro de animales implican recoger datos para cada animal a lo largo de todo su ciclo vital de modo que puedan seguirse las características individuales y la historia del animal. Estos datos pueden incluir, pero no se limitan necesariamente a, la fecha y el lugar de nacimiento, la ascendencia, el sexo, el movimiento geográfico, la salud y la historia de tratamiento y otros archivos de producción. Las industrias de la ganadería y el procesamiento de alimentos, en particular, se han implicado mucho en este ámbito en un esfuerzo para incrementar la productividad y la rentabilidad en el tratamiento del ganado, así como desarrollar una estrategia para identificar, rastrear y tratar los riesgos en el ámbito de la seguridad alimentaria y los brotes de enfermedades infecciosas en el ganado. Las consideraciones de salud y seguridad demandan que los orígenes de los productos alimenticios estén claros. Además, los consumidores demandan actualmente y algunos países requieren actualmente que los orígenes de los productos cárnicos sean rastreables de modo que puedan llevarse a cabo eficazmente y fiablemente auditorías y procedimientos de verificación de garantía de calidad. Un sistema de registro o seguimiento en papel sería suficiente para rastrear los productos cárnicos hasta el sistema o la granja de origen. No obstante, los papeles pueden perderse, las etiquetas deteriorarse durante el almacenamiento en un congelador y se cometen errores de archivo. El sistema reivindicado tiene la ventaja de que si un resultado es dudoso o controvertido, las muestras en cuestión pueden volverse a probar mediante una tercera parte independiente. Sin embargo, existe un reto significativo, ya que actualmente no existe un sistema uniforme para identificar y rastrear animales con suficiente especificidad. En lugar de eso, ha surgido a lo largo del tiempo una multitud de convenciones de identificación y registro de animales que varían ampliamente dependiendo de factores tales como la localización geográfica de la explotación ganadera y/o el fabricante del sistema de rastreo de animales particular. Un ejemplo es la falta de uniformidad basada en la localización geográfica que es evidente en los Estados Unidos, en donde cada estado determina su propio esquema de identificación de animales para granjas ganaderas situadas dentro del estado. Otro ejemplo es, en la actualidad, que se usan diversos métodos y combinaciones de métodos en un intento de asegurar la identidad y la fuente de los productos cárnicos a través de una base de partidas o remesas, con lo que los números de partida/remesa se aplican a las partidas/remesas a partir de la fuente, a través del procedimiento de matanza hasta el consumidor. Sin embargo, estos ejemplos demuestran que los métodos actuales consumen mucho tiempo, son engorrosos y requieren considerables recursos de los granjeros, los procesadores y el gobierno u otras agencias. Así, esta falta de uniformidad es problemática ya que se hace crecientemente difícil rastrear información relativa a un animal específico. La utilidad de los datos recogidos está así comprometida, socavando de ese modo objetivos de la industria tales como incrementar la productividad y rastrear al animal a lo largo de todo su ciclo vital. También incrementa el tiempo requerido para rastrear la exposición a seres humanos y elementos potenciales de seguridad alimentaria, mientras se limita la extensión de enfermedades infecciosas que en ciertas circunstancias pueden conducir a una exposición adicional a riesgos sanitarios evitables para seres humanos y la extensión de enfermedades confinables para animales que a su vez podrían conducir a la eliminación de grandes números de animales. El tratamiento del riesgo está claramente asociado con los sistemas de recogida de datos y tratamiento de información que una explotación de animales bien desarrollada ya debe tener establecidos.

La capacidad para identificar y seguir productos alimenticios a través de la cadena alimentaria y el nivel de detalle retrospectivamente hasta la granja o el sistema de producción de origen se está convirtiendo en un procedimiento requerido para afrontar elementos de seguridad para seres humanos. La importancia de un sistema para rastrear productos alimenticios se ilustra mediante muchos ejemplos recientes, incluyendo problemas con residuos en frutas y hortalizas, dioxina en aves de corral y contaminación con *E. coli* 0157 y encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en productos vacunos. También es cada vez más un requerimiento de los minoristas para garantizar la comestibilidad del producto alimenticio a sus clientes. Puede observarse que actualmente y en el futuro existe un requerimiento creciente de verificar la calidad de los productos. La presente invención cumple esta necesidad y este deseo de larga duración en la especialidad.

A medida que la investigación genética y genómica extiende su influencia a la producción de alimentos, hay un requerimiento de mantener la integridad de la cadena de modo que los beneficios de seleccionar genotipos específicos se obtengan a través de la cadena hasta el punto en el que pueda explotarse el beneficio. Actualmente, es posible seleccionar alelos específicos de genes en vacas y cerdos que dan como resultado carne con calidad de carne o comestibilidad mejoradas a juicio del procesador y el consumidor. Así, es probable que estos alelos/genos se especifiquen y que los miembros de la cadena requieran la confirmación de que pueden verificarse las demandas resultantes. Hoy en día existe una necesidad de identificar positivamente la genética que se considera que es parte de un programa o paquete formulado para aportar características de las reses muertas y atributos de calidad de la carne específicos.

Ahora es posible establecer tal sistema de rastreabilidad usando papel o pasaportes electrónicos que rastrearán a un animal individual desde el nacimiento hasta la matanza y se conectarán con etiquetas u otras formas de identificación de animales tales como obtención de imágenes retinales. Sin embargo, estos sistemas pueden ser objeto de fraude, aunque se está desarrollando tecnología para conectar los dos componentes (pasaporte y animal) entre sí. No obstante, estos procedimientos y la tecnología disponible actualmente solo pueden seguir a la red muerta hasta la mesa de

despiece; el punto en el que el animal se divide en cortes primarios, cuartos, etc. Una vez que estos cortes primarios se distribuyen en las diferentes mesas de deshuese, la identidad del producto y el pasaporte se pierden al menos desde una perspectiva de la res muerta individual. Los lotes o remesas pueden estar todavía contenidos, aunque es difícil mantener una separación clara entre estos lotes y está sujeto a error y esto aumenta significativamente el coste de producción. Además, la diseminación del producto a otras plantas para un procesamiento adicional también incrementa el problema.

El documento WO98/39475 divulga un método para identificar a un animal del que se deriva un producto cárnico, que comprende genotipificar la carne, comparar el genotipo con genotipos animales conocidos y localizar una coincidencia del genotipo para correlacionar la muestra retrospectivamente hasta el animal original. El genotipo de la muestra del producto animal se correlaciona retrospectivamente con su fuente natural usando la probabilidad.

Madec F. *et al* "Traceability in the pig production chain" - París, FR, Vol. 20, nº 2, agosto de 2001, páginas 523-537, menciona cómo puede usarse DNA como un medio para complementar el etiquetado electrónico para rastrear productos cárnicos en la cadena alimentaria.

Existe una necesidad de desarrollar datos genéticos en un sistema acumulativo, exhaustivo y dinámico de tratamiento de bases de datos para potenciar de ese modo la predecibilidad sanitaria y la longevidad de los animales. El sistema reivindicado tiene la marcada ventaja de usar información de DNA para rastrear productos cárnicos hasta el sistema o la granja de origen. En la presente invención se presenta un método para usar marcadores de DNA como un medio para identificar animales individuales al obtener genotipos de todos los progenitores prospectivos como referencias que han de introducirse en una base de datos y a continuación comparar genotipos de muestras de descendientes con esta base de datos para identificar los progenitores prospectivos para cada descendiente. De forma similar, el análisis de paternidad usando marcadores de DNA puede usarse en un sistema para identificar la fuente de reses muertas y cortes de carne individuales (descendiente) con una granja específica (progenitores). La presente invención es menos costosa que los sistemas de rastreo de DNA existentes basados en la identidad, ya que la presente invención no tiene que conservar muestras de todos los animales sacrificados, ni obtener la huella dactilar de todos los animales sacrificados. En el futuro, si alguna vez se usa clonación en la industria granjera, el sistema reivindicado también sería eficaz con tal de que los clones dados fueran únicos para un sistema/una granja particular.

Por las razones precedentes, existe una necesidad de un sistema que rastree animales a través de un método de marcadores de DNA eficaz y económico. El método de la presente invención comprende la primera etapa de proporcionar un sistema de identificación universal para animales, tales como cerdos, que permita la identificación y el tratamiento para rastrear productos alimenticios a través de la cadena alimentaria.

De acuerdo con esto, un objetivo principal de la invención es un método de análisis genético que usa la obtención de la huella dactilar de DNA para proporcionar una rastreabilidad completa para la cadena de producción animal, con lo que se requiere la recogida de muestras parentales y la recogida de muestras de los grupos de descendientes proporciona una base de datos necesaria para el uso futuro.

Otro objetivo de la invención es la obtención del perfil sanitario de un animal que determina las características de ese animal a través de la obtención del perfil de DNA parental.

Un objetivo adicional de la invención es la obtención del perfil sanitario de un animal que determina las características de ese animal a través de la obtención del perfil de DNA parental. Un objetivo adicional de la invención es la obtención del perfil sanitario de un animal que comprende datos genéticos de animales que posibilitan datos de determinación de la salud de los animales, para permitir de ese modo un análisis que predice la salud, la enfermedad y las probabilidades de trastornos.

Otro objetivo más de la invención es un método para utilizar los datos genéticos de animales para proporcionar una base de datos universal que haga posible un sistema de rastreabilidad para toda la cadena de producción.

El método y los medios para conseguir cada uno de los objetivos anteriores se harán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención que sigue. Objetivos y ventajas adicionales de la invención también se indicarán en parte en la descripción detallada y en parte serán obvios a partir de los ejemplos, o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los objetivos y las ventajas de la invención se obtendrán por medio de los instrumentos y las combinaciones particularmente apuntados en las reivindicaciones de la invención.

Sumario de la invención

La presente invención divulga un método para rastrear un producto animal hasta su unidad de producción o granja de origen, que comprende; obtener una muestra de dicho producto animal; genotipificar dicho producto animal utilizando un sistema basado en marcadores de DNA para obtener información de genotipificación; comparar la información de genotipificación de dicho producto animal con una base de datos de referencia, en donde dicha base de datos de referencia comprende perfiles de marcadores de DNA de animales progenitores únicos para una unidad de producción o granja, o para diferentes unidades de producción o granjas; analizar dicha información de genotipificación con dicha referencia para determinar un sistema o granja de origen para dicho producto.

La presente invención divulga un método para identificar animales que permite que la tecnología de marcadores de DNA rastree productos cárnicos usando un sistema de paternidad que ha de utilizarse para proporcionar económicamente rastreabilidad completa para la cadena de producción del animal hasta la unidad de producción o granja de origen. Este método requiere usar marcadores de DNA como un medio para identificar la paternidad de animales individuales, identificar la fuente de las reses muertas y los cortes de carne individuales y la unidad de producción o granja de origen precisa de los animales seleccionados. La recogida de muestras parentales, la recogida de grupos de descendientes, las muestras de abuelos, el muestreo basado estadísticamente en diversos puntos de control a través de la cadena y los sistemas de verificación de DNA para demostrar el origen, tanto genético como por la localización de las muestras a través de la cadena, se requieren para poner en práctica y verificar eficazmente la presente invención. La información del genotipo se introducirá y a continuación se cargará por medios bien conocidos por los expertos en la especialidad tales como cargas de archivos o conexión de bases de datos. La información del genotipo y el muestreo se extraerá a continuación de la base de datos y se ejecutará a través del software de análisis de datos descrito en los Ejemplos. Para el análisis de paternidad, esto puede realizarse usando programas comerciales disponibles conocidos por los expertos en la especialidad. El sistema puede potenciarse adicionalmente a través de la integración con tecnología de tratamiento de información, tal como usando presentación e identificación de resultados basadas en la red.

Al crear este sistema utilizando estos componentes discretos y diferentes, la presente invención proporciona una conservación de identidad económica para productos animales. Este sistema tiene ventajas específicas sobre sistemas existentes en términos de facilidad de uso a lo largo de la cadena de producción y el coste de la puesta en práctica. Además, el sistema puede adaptarse para ajustarse a los requerimientos en cada punto de la cadena incrementando de ese modo la robustez del sistema con respecto al fraude. Estos factores incrementan la utilidad y son importantes para asegurar la adopción y la puesta en práctica requeridas por los participantes en la cadena. Aspectos, características y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones actualmente preferidas de la invención dadas con el propósito de divulgación.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 demuestra la distribución de tamaños de alelos clasificados para los marcadores SW2623 y SO301. El eje X = número de observaciones y el eje Y = tamaño del alelo, según se designa mediante el software Genotyper.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

La presente invención utiliza la exactitud de la tecnología del DNA para mostrar un sistema de rastreabilidad para el animal individual o el grupo de animales, tal como una unidad de producción, hasta el sistema o la granja de origen. Este sistema permite al profesional sanitario, productor, procesador y minorista obtener información acerca de animales específicos y su descendencia para estimar la presencia y la frecuencia de enfermedad, identificar rasgos heredables deseables y promover un sistema uniforme detallado.

Los organismos vivos ofrecen una huella dactilar individual única en su DNA. Por lo tanto, el DNA proporciona la posibilidad de mantener la rastreabilidad desde el nacimiento hasta el consumo. Sin embargo, desde un punto de vista práctico, el uso actual de la tecnología del DNA con este propósito es una tarea inmensa que requiere un tratamiento intenso y un coste relativamente alto ya que se basa en probar la identidad. Aunque se están desarrollando sistemas basados en la identidad para ternero y cordero, tales como IdentiGen en Irlanda y Easi-trace en Nueva Zelanda, estos no son verdaderamente aplicables a cerdos. La recogida de muestras, la genotipificación, el análisis de datos, el coste frente al valor de la res muerta y los números totales de animales que necesitarían tipificarse han impedido la aplicación de esta tecnología en especies tales como perros, vacas, gatos, caballos y ovejas.

El método de la presente invención proporciona la capacidad para identificar de forma única animales de un modo uniforme y coherente usando tecnología de DNA que permite un acceso rápido y fácil a los datos recogidos y así la capacidad para rastrear productos cárnicos hasta el sistema o la granja de origen. El programa de rastreabilidad reivindicado puede establecerse con el uso de entre 10 y 100 marcadores tipo microsatélite, pero preferiblemente entre 20 y 50 marcadores tipo microsatélite, para identificar el animal desde fuera del sistema o la granja de origen controlados. La presente invención minimiza así la cantidad de tiempo requerida para rastrear enfermedades, reduciendo de ese modo el riesgo de tener animales libres de enfermedad que se infecten, y reduciendo los riesgos sanitarios asociados para seres humanos. El método de la presente invención también es ventajoso ya que proporciona la capacidad de identificar animales independientemente del fabricante del sistema de rastreo de animales particular empleado por la empresa ganadera. El presente sistema utilizará una base de datos y un sistema de almacenamiento de muestras que pueden agruparse en un formato fácil de usar utilizando software fácilmente disponible para el análisis. Además, la invención reivindicada es menos costosa que sistemas de DNA previamente utilizados basados en la identidad, ya que la presente invención no requiere que se mantengan muestras de todos los cerdos para matanza, ni todos los animales deben haberse sometido a obtención de la huella dactilar de DNA. Esto se debe al hecho de que el sistema reivindicado se basa en la paternidad y por lo tanto puede realizarse usando solamente muestras de carne posteriores a la matanza. Otra ventaja única de la presente invención es el hecho de que se reduciría significativamente el número efectivo de sementales genéticamente diferentes en el sistema o la granja, permitiendo de ese modo menos marcadores y así el sistema de rastreabilidad reivindicado reduciría costes significativamente. Esto permite que el productor o los productores de ganado y los procesadores de alimentos recojan y rastreen más fácilmente datos de un animal individual durante su ciclo vital proporcionando una productividad incrementada y protegiendo la salud general y el bienestar de los trabajadores, los consumidores y los animales.

La presente invención es un método para identificar al animal del que se deriva un producto alimenticio, que comprende muestrear el tejido del animal, extraer material genético de la muestra, llevar a cabo un análisis genético sobre el material genético extraído y codificar los resultados del análisis genético molecular, introducir la información de la muestra y el análisis genético codificado en una base de datos y permitir que la información de la muestra pueda explorarse para discernir el análisis genético molecular de un animal. La presente invención divulga un procedimiento mejorado para el análisis de marcadores de DNA usando muestras de paternidad, muestras de referencia de un descendiente y otras formas de análisis de la secuencia de ácidos nucleicos que permiten el análisis rápido y simultáneo de un gran número de marcadores de DNA. El sistema reivindicado es único ya que se basa en la paternidad. Esto da como resultado un sistema muy económico ya que se usan en la industria muchos menos sementales que madres. Con tal de que se use exclusivamente un grupo de sementales dentro de un sistema o una granja, entonces la carne procedente de cerdos de para matanza, por ejemplo, derivada de ese sistema o granja puede rastrearse eficazmente hasta el sistema o la granja. No obstante, la invención reivindicada es igualmente aplicable para un sistema o granja que comparta verracos (a través de inseminación artificial) con otros sistemas o granjas. En este caso, el sistema se basaría en la maternidad. La cantidad de prueba (obtención de la huella dactilar) del grupo de referencia necesitaría incrementarse en esta situación ya que este comprendería ahora todas las madres del sistema o la granja (en oposición a los sementales) y así los costes globales se incrementarían algo, pero la invención reivindicada permitiría una capacidad mejorada para rastrear carne o productos cárnicos inequívocamente hasta su sistema o granja de origen. El alto contenido de información esperado de este sistema facilitará muchos tipos de análisis genético y hará posible un sistema de rastreabilidad mejorado y más uniforme que proporcionará diferentes opciones de rastreabilidad, tales como rastreabilidad parcial si está justificado. Esta invención también proporciona un método mejorado para obtener ácidos nucleicos extraídos de diferentes muestras biológicas. La identidad de los individuos se evalúa a través de "tipificación de DNA" y a continuación los genes asociados con el individuo específico se identifican y se mapean en sitios específicos de los cromosomas. En este procedimiento de obtención de la huella dactilar de DNA, las variaciones en la secuencia de DNA de diferentes individuos de una especie (polimorfismos de la secuencia de DNA) se revelan por diferencias en el patrón cuantitativo de unión de fragmentos de DNA preparados a partir de diferentes individuos a una serie de unos pocos cientos a unos pocos miles de sondas oligonucleotídicas.

El sistema de la presente invención se establece de acuerdo con los requerimientos de la cadena de producción, pero una unidad básica es una unidad de producción tal como una granja individual. Los animales hembra (madres) se seleccionan para abastecer el sistema y una muestra de DNA se toma y se almacena como parte del pasaporte del individuo que proporciona una muestra de referencia así como registros de identificación (tales como número de etiqueta de ID, etc.). Será apreciado por los expertos en la especialidad que puede usarse una variedad de métodos para conectar el pasaporte con el animal, incluyendo transpondedores electrónicos, sistemas de exploración retinal o sistemas de exploración del iris. A su vez, los animales macho (sementales) se seleccionan para aparearse con estas madres. Estos animales macho se seleccionarán típicamente para usarse únicamente dentro del sistema o en sistemas relacionados. Como con las madres, se toman muestras de los sementales para referencia. Se generan perfiles de DNA para estos animales progenitores usando cualquier sistema basado en marcadores de DNA que proporcione el poder discriminatorio necesario. Un ejemplo, puede ser necesario que los sementales se segreguen para el uso solamente dentro de un único sistema de producción y se cuenta con la práctica de que las madres solo están situadas en granjas especificadas o en una granja particular durante un tiempo especificado. Los marcadores son polimórficos, dando de ese modo a cada individuo diferente una unicidad que es identificable y rastreable. Tales marcadores pueden seleccionarse de microsatélites, polimorfismos de un solo nucleótido específicos (SNP), marcadores de AFLP o deleciones o inserciones de toda, o parte de, la secuencia de DNA genómico. El tipo de marcador no es particularmente importante, pero estos marcadores se seleccionarán para aportar el sistema más eficaz. Por ejemplo, usando marcadores tipo microsatélite altamente polimórficos, es posible verificar fácilmente la paternidad de un animal si también están disponibles las muestras de los progenitores. En algunas situaciones, marcadores de SNP específicos pueden proporcionar una discriminación de primera fase muy eficaz. Un productor de cerdos, por ejemplo, puede querer utilizar sementales Duroc ya que se prefieren en algunos mercados por los atributos de calidad de la carne, el cerdo Duroc tiene un polimorfismo específico en el gen MC1R que es diagnóstico para esta raza, de modo que un cerdo de este sistema debe contener al menos un alelo Duroc. Cualquier muestra que sea negativa para este alelo Duroc puede excluirse del sistema. Este planteamiento puede aplicarse para alelos de otros genes que se especifican, tal como en los Estados Unidos algunos procesadores especifican la ausencia del gen del halotano. En tal sistema, cualquier cerdo que tenga el gen del halotano puede excluirse. Esta es una característica importante del sistema de la presente invención ya que el genotipo especificado del individuo se usará para demostrar la conformidad con los requerimientos del sistema y es probable que en el futuro los productos (carne) resultantes del animal se valoren basándose en el genotipo específico. Será evidente para los expertos en la especialidad que son necesarias técnicas para identificar los marcadores y no se pretende que la invención esté limitada por tales realizaciones o mecanismo ilustrativos.

El sistema de rastreabilidad de la presente invención también tiene otros beneficios significativos. Por ejemplo, los sementales de cualesquiera cerdos nacidos en el sistema o la granja con defectos genéticos pueden rastrearse inmediatamente. Sacrificar estos verracos (y las madres si está justificado) presenta la ventaja de reducir la incidencia de defectos congénitos en el sistema o la granja. Lo siguiente es sólo un ejemplo del uso reivindicado de herramientas de obtención de la huella dactilar de DNA para identificar un verraco para inseminación artificial que tiene un defecto genético cardíaco previamente desconocido. Lechones con una afección conocida como cerdos "fútbol" se observaron en granjas que usaban semen de un criadero para inseminación artificial particular, pero debido a que el criadero usaba el semen de varios verracos para elaborar sus dosis comerciales de inseminación artificial, no se podría identificar si eran responsables uno o varios verracos, si esta era una enfermedad infecciosa o si estaba provocada por algo del

ES 2 343 243 T3

ambiente. La invención reivindicada que usa el sistema basado en herramientas de paternidad y rastreabilidad permitiría mostrar que un solo verraco ha engendrado los lechones afectados.

Otro ejemplo de los beneficios del sistema reivindicado es la capacidad de comprobar la fertilidad de los sementales en un sistema o una granja. Por ejemplo, esto se consigue mediante muestreo y obtención de la huella dactilar de los cerdos después de la matanza y a continuación comparando la proporción real de descendientes engendrados por un verraco dado con la proporción de descendientes que se esperaría que se engendraran basándose en su contribución conocida a las dosis de inseminación artificial usadas en el sistema o la granja. Esto permite que se identifiquen y sacrifiquen verracos subfértiles o infértiles previamente no diagnosticados. Esto también proporciona las ventajas claras de elevar la fertilidad global del sistema o la granja. Actualmente, los verracos de un criadero se comprueban con respecto a la calidad de su semen en términos de concentración, movilidad y morfología del esperma. Si su semen está mezclado con el de otros verracos para producir dosis de inseminación artificial, entonces su fertilidad no puede controlarse. Se conocen muchas condiciones en las que la concentración, la movilidad y la morfología del esperma de mamíferos macho pueden parecer normales, pero el macho tiene una fertilidad pobre (p. ej. translocaciones recíprocas, mutaciones en genes implicados en el esperma/el reconocimiento del huevo, etc.).

El sistema de rastreabilidad reivindicado también tiene la capacidad única de proyectar un sistema basado en los abuelos en oposición al uso de la paternidad o la maternidad. Esto permite una ventaja clara de requerir un número muy reducido de huellas dactilares de animales de referencia en la base de datos, lo que también conduciría a costes disminuidos. Este enfoque sí requiere un enfoque diferente debido a que un individuo no tiene que compartir un alelo con su abuelo en cada locus. Por lo tanto, la exclusión de un abuelo candidato no es posible del mismo modo que puede excluirse un progenitor candidato cuando no existe alelo coincidente en un locus. La invención reivindicada permite adoptar un enfoque de exclusión si se muestrea la pareja de abuelos paternos o abuelos maternos. Un individuo debe tener al menos un alelo en común con el grupo de cuatro alelos en los dos abuelos por parte de padre, y un alelo con el grupo de cuatro alelos en los dos abuelos por parte de madre. Las probabilidades de exclusión se calculan de forma similar a la situación de los progenitores/descendientes. Por ejemplo, para un marcador de dos alelos, se tendría lo siguiente:

Alelos de los nietos	Alelos de los abuelos				
	1111	1112	1122	1222	2222
11					0,015625
12					
22	0,015625				

Solo la combinación de 1111 abuelos con 22 nietos o 2222 abuelos con 11 nietos excluiría esta combinación de los dos abuelos. La probabilidad de exclusión para individuos no relacionados (usando un marcador con dos alelos igualmente frecuentes) es:

$$2 \times (\text{frec } 1)^4 \times (\text{frec } 2)^2 = 2 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 \times 0,5 = 2 \times 0,0625 \times 0,25 = 0,01325$$

Cada uno de los dos abuelos en la pareja con 1111 alelos todavía podría ser un abuelo verdadero junto con otro abuelo candidato, por lo tanto, es necesario que se prueben todas las posibles combinaciones de semental abuelo + hembra abuela.

Ha habido otras opciones para asignar abuelos o bisabuelos a un individuo, de uno en uno. En una publicación reciente, Milligan (2003) desarrolló un estimador de posibilidades para la relación entre dos individuos cualesquiera basándose en los genotipos de los marcadores solamente y otros métodos revisados. Milligan, Brook G., Maximum-Likelihood Estimation of Relatedness, Genetics; 163, páginas 1153-1167 (2003). Se observó que el método de las posibilidades era eficaz con relaciones tan distantes como primos primeros, que tienen el mismo grado de relación que un bisabuelo y su bisnieto, e incluso con individuos no relacionados. En el sistema de rastreabilidad reivindicado, se sabría a qué generación pertenece un individuo. Esto es extremadamente útil para pares de individuos con relaciones de 0,25, por ejemplo, hermanastros. La presente invención permite llevar un control de a qué generación pertenece un individuo muestreado, por lo tanto, no hay necesidad de distinguir entre un hermanastro y un abuelo. Será necesario distinguir entre una relación de 0,25 (abuelo verdadero) y 0,125 (hermano completo a abuelo verdadero), no obstante, el número incrementado de marcadores necesarios para realizar esto, algo mayor de 30 marcadores, será simple de obtener. Además, será necesario un número reducido de genotipos de referencia, dando como resultado un sistema menos costoso, globalmente. Para el análisis de abuelos, el análisis puede realizarse mediante un programa informático que es similar a los mencionados anteriormente para el análisis de paternidad. La capacidad para proyectar tal sistema es otra realización única más de la invención reivindicada.

ES 2 343 243 T3

En el sistema de la invención reivindicada, también han de recogerse muestras de la progenie, sin embargo, en este caso, no es necesario tipificarlas. Por el contrario, estas muestras se almacenan como muestras de referencia si se encuentran problemas o se requiere un mayor nivel de verificación. En algunas situaciones, ni siquiera sería necesario codificar estas individualmente sino que en cambio pueden agruparse por grupo de nacimiento, tal como la camada en cerdos, la edificación, el día o la semana o el mes de nacimiento, etc. Esta es una ventaja importante y única de la presente invención sobre productos previos en los que se requiere que todos los individuos sean tipificados.

Por ejemplo, si una pieza de carne o envase al por menor individual necesita rastrearse hasta el sistema, tal como resultado de contaminación por productos corporales extraños u otro problema tal, puede realizarse eficazmente como parte de un sistema bifásico. La información sobre el lote o el sistema procedente del envase o el documento de venta se combina con una muestra biológica para proporcionar DNA para el análisis y se envía al laboratorio de referencia. Es aquí donde se determina el perfil de DNA y se coteja con las muestras parentales para determinar si hay una coincidencia con el sistema. Esto describe la forma reivindicada de una prueba de paternidad. Debe apuntarse que esto puede afinarse adicionalmente basándose en la fecha de nacimiento y/o producción del animal. Si hay una coincidencia con el sistema, dará como resultado la identificación de partidas potenciales tales como camadas para cerdos. Una vez que se hace esto, puede realizarse a continuación un cotejo más exacto sobre una base individual de un modo mucho más eficaz y económico que tipificando individualmente cada res muerta. En la presente invención, la muestra se explora frente a los individuos con respecto a una identidad específica. La probabilidad de que se obtenga una coincidencia con un individuo no idéntico será infinitesimal al usar este enfoque.

El sistema puede potenciarse adicionalmente a través de la integración con tecnología de tratamiento de información tal como usando presentación e identificación de resultados basadas en la red. La información de la muestra puede introducirse a través de carga de archivos o interfaz de red u otros medios conocidos en la especialidad. La información de la muestra incluirá, pero no se limita a, fecha de la muestra, localización del animal (p. ej., número de granja, establo), estado del animal (p. ej. progenitor, cerdo para matanza), información del transporte de la muestra e información del almacenamiento de la muestra. La información del genotipo se introducirá y a continuación se cargará por medios bien conocidos por los expertos en la especialidad tales como carga de archivos o conexión de bases de datos. La información del genotipo y el muestreo se extraerá a continuación de la base de datos y se ejecutará a través del software de análisis de datos descrito en los Ejemplos. Para el análisis de paternidad, esto puede realizarse usando programas comerciales disponibles conocidos por los expertos en la especialidad. Para el análisis de los abuelos, el análisis puede realizarse mediante un programa informático que es similar a los mencionados anteriormente.

Puede observarse que usando este sistema puede obtenerse un enfoque económico para la rastreabilidad completa de la cadena alimentaria, que no es posible usando simplemente la identidad individual. El sistema de la invención requiere un alto nivel de organización así como la capacidad de combinar genotipos de animales progenitores y diferentes sistemas de marcadores de DNA y tecnología de tratamiento y transferencia de datos a fin de poder aportar un sistema eficaz para especies recogidas en grandes volúmenes y con un valor de la res muerta relativamente bajo, tal como el cerdo en comparación con el ganadp bovino. El sistema es único y la invención descrita en la presente memoria representa un avance fundamental para la rastreabilidad de productos animales en la cadena de producción, en particular para productos cárnicos de alta calidad. Además, puede observarse que las ventajas potenciales también pueden aplicarse para productos animales de menor volumen y mayor calidad tales como la ternera.

La presente invención muestra un número de beneficios que son obtenidos por los que ponen en práctica la invención reivindicada. Estos incluyen una mayor capacidad para cumplir requisitos reguladores actuales y futuros, mejora de la imagen de la industria, credibilidad a través de la claridad de la industria para garantizar la seguridad del alimento y también verificar demandas de los productos tales como la calidad del producto alimenticio debido a un genotipo específico, declaración de seguridad de la fuente alimentaria, verificación de las demandas para un sistema de granja, por ejemplo, beneficio orgánico y similares, y un valor potenciado del producto debido a la presencia de genes específicos (como se demuestra con los marcadores genéticos) que indican un grado superior de calidad y valor o demuestran conformidad con la especificación.

En conclusión, la presente invención divulga un sistema para rastrear a un animal individual desde el nacimiento hasta el consumo. Además, la realización de tal objetivo es mostrada por la presente invención a través de un método preciso y económico por el que se permite el uso de datos de investigación genéticos y genómicos potenciados y la mejora de elementos de seguridad alimentaria humana.

Definiciones

Para los propósitos de esta solicitud, los siguientes términos tendrán las definiciones citadas en la presente memoria. Las unidades, los prefijos y los símbolos pueden indicarse en su forma aceptada por el SI. A no ser que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi, respectivamente. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo e incluyen todos los números enteros dentro del intervalo definido. Los aminoácidos pueden mencionarse en la presente memoria mediante sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-ILTM Biochemical nomenclature Commission. Asimismo, los nucleótidos pueden mencionarse por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados. A no ser que se estipule otra cosa, los términos de software, eléctricos y electrónicos, según se usan en la

ES 2 343 243 T3

presente memoria, son como se definen en The New IRRE Standard Dictionary of Electrical and Electronics Terms (5ª edición, 1993). Los términos definidos posteriormente se definen más a fondo mediante referencia a la memoria descriptiva como un todo.

5 Según se usa en la presente memoria, un “animal” es cualquier especie cuya carne sea vendida comercialmente bien para consumo humano o bien para consumo animal. Especies de animales incluidas, pero no limitadas a, son ganado bovino, peces, cabras, ganado ovino, ganado porcino, aves de corral, mariscos y camarones.

10 Según se usa en la presente memoria, una “unidad básica” es una unidad de producción tal como una granja individual, en la que las madres y/o los sementales están situados en granjas especificadas o en una granja particular durante un tiempo especificado.

15 Según se usa en la presente memoria, “marcador” incluye una referencia a un locus en un cromosoma que sirve para identificar una posición única en el cromosoma. Un “marcador polimórfico” incluye la referencia a un marcador que aparece en múltiples formas (alelos) tales que diferentes formas del marcador, cuando están presentes en un par de homólogos, permiten que sea seguida la transmisión de cada uno de los cromosomas de ese par. Un genotipo puede definirse mediante el uso de uno de una pluralidad de marcadores.

20 Según se usa en la presente memoria, “ácido nucleico” incluye la referencia a un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico en forma bien de una sola hebra o bien de doble hebra, y, a no ser que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales ya que se hibridan a ácidos nucleicos de una sola hebra de un modo similar a los nucleótidos presentes en la naturaleza (p. ej., ácidos nucleicos peptídicos).

25 **Ejemplos**

Introducción

30 Un proyecto piloto para un esquema de rastreabilidad se diseñó alrededor de dos unidades de puercas (SU1 y SU2) que utilizan ambas semen procedente de un criadero de verracos común (BS1). El criadero de verracos BS1 aloja aproximadamente 25 sementales PIC línea 337. SU1 y SU2 son ambas unidades de 600 puercas (que paren 25 camadas/semana) que utilizan hembras progenitoras PIC C22. Ambas granjas mantienen buenos registros de producción en granja.

35 También se tomaron muestras de tejido de cerdos para matanza PIC337 x C22 no relacionados que se originan a partir de un sistema de producción no relacionado (Sistema II). Estas muestras se utilizaron como un control negativo contra cerdos que se originan a partir del sistema descrito anteriormente.

40 Se proponen marcadores de DNA como un medio para identificar la paternidad de animales individuales. Además, el análisis de paternidad mediante marcadores de DNA había de evaluarse como un sistema para identificar la muestra de reses muertas y cortes individuales de carne con una granja específica.

45 *Materiales*

Muestras

50 Se realizó un muestreo en la granja para obtener muestras de DNA de los 21 verracos presentes en BS1 en el momento del muestreo y de 13 camadas (4 lechones cada una) con sus cerdas para cada una de las dos unidades de cerdas, SU1 y SU2. A partir del Sistema II, se obtuvieron 50 muestras de DNA de cerdos no relacionados con el sistema de prueba.

55 En la planta de matanza, se tomaron muestras de reses muertas identificadas como suministradas por SU1 y SU2. Se tomaron muestras de piel e ijada de 50 reses muertas de cada una de las granjas y 15 muestras de jamón de cada granja. En ambas granjas se muestrearon cerdas adicionales que se esperaba que fueran progenitoras de las reses muertas muestreadas.

60

65

ES 2 343 243 T3

Muestras totales

TABLA 1

Detalle del número de muestras por fuente (granja) y tipo de animal o tipo de corte muestreado

Fuente de animales	verracos	madres a	descendientes b	piel	ijada	jamón
BS1	21(+2)	-	-	-	-	-
SU1	-	14	119	56	50	15
SU2	-	14	50	56	50	15
Sistema II	-	-	-	50	-	-

Marcadores

Un grupo de 9 marcadores publicado por PE AgGen para el análisis de paternidad en cerdos se usó como la base para un grupo de 12 marcadores. Doce marcadores es el límite actual para un solo ensayo en el genotificador ABI (4 colores x 3 intervalos de tamaños de marcadores). Dos de los marcadores del grupo de PE AgGen no se usaron. SW2160 es el 5º marcador en su intervalo de tamaño, y SW840 está conectado a otro marcador del grupo. Se añadieron cinco marcadores al grupo de AgGen a partir de marcadores de MS usados en el proyecto European Biodiversity (<http://databases.roslin.ac.uk/pigbiodiv>). Se usaron tres criterios para estos marcadores adicionales. En primer lugar, tenían que estar desconectados de cualquiera de los marcadores ya en el grupo de 12. El segundo criterio era que el polimorfismo fuera informativo promediado sobre 9 líneas PIC. En tercer lugar, su intervalo de tamaños tenía que ajustarse a una de las posiciones restantes (máximo de 4 en el mismo intervalo).

El grupo final de marcadores es como sigue:

TABLA 2

Marcadores tipo microsatélite usados para el análisis de paternidad

Color	Marcador	Intervalo de tamaños	SSC	~CM
Tet	SW1430	159-181	1	
Fam	SW2623	123-149	2	10cM
Fam	S0226	169-231	2	75cM
Fam	SW72	100-118	3n	
Tet	S0097	208-248	4	120cM
Fam	S0301	254-266	4	27cM
Ned	SW122	110-122	6	
Vic	TNFB	156-216	7	
Ned	SW857	144-160	14	
Tet	SW936	80-117	15	
Ned	SW2411	179-229	16	
Vic	SW24	89-121	17	

Según se muestra en la Tabla 2, no hay exactamente 3 marcadores por color. Esto ocurría debido a que uno de los marcadores ya estaba disponible con el colorante azul (Fam) y no se solapaba con los otros 3 marcadores en este color. Los cromosomas 2 y 4 tienen cada uno dos 2 marcadores sobre ellos pero están separados al menos 65 cM y por lo tanto esencialmente desconectados.

ES 2 343 243 T3

Software

5 *El análisis del genotipo* puede realizarse usando el software Genotyper® que está provisto de la máquina ABI para recibir los tamaños de alelos para cada uno de los marcadores. Este software se construye para ser completamente automático, pero en este momento es necesaria una comprobación manual de sus resultados. El resultado del Genotyper® listará los tamaños de los alelos en unidades de pares de bases, hasta dos decimales.

10 *Análisis de paternidad:* La lista del software de conexión de la Rockefeller University se exploró con respecto al software de análisis de paternidad. Se encontraron las siguientes aplicaciones y pueden utilizarse en la presente invención: SALP, Borel, Cervus, Newpat/identity, Kinship). Preferiblemente, debe usarse Cervus ya que funciona en PC y está disponible soporte si es necesario. Cervus puede manejar fácilmente genotipos perdidos, errores de genotipo y por lo tanto funcionará bien con datos reales. Además del análisis de datos, Cervus tiene algunas herramientas de simulación que permiten la predicción de la potencia de un cierto grupo de marcadores para parámetros de población específicos.

15 *Categorías de alelos:* Se ha escrito una aplicación SAS para recodificar las valoraciones alélicas procedentes del resultado del Genotyper® para integrar números de alelos basándose en los intervalos observados de cada uno de los alelos. Los resultados fuera de los intervalos predefinidos o las denominaciones de genotipos de otro modo inutilizables se ponen en una lista para una investigación adicional. La aplicación SAS escribe todos los genotipos utilizables para un archivo de entrada de Cervus y/o para un archivo de salida fácil de interpretar para los usuarios.

20 *Almacenamiento de genotipos:* Esto se realiza actualmente en archivos maestros de Excel. En la actualidad, puede utilizarse una base de datos de Access para el almacenamiento de resultados de genotipos. En el futuro, el prototipo de Access puede programarse en una base de datos de Oracle. Para el almacenamiento de genotipos, la base de datos será simplista. Rasgos adicionales como información del almacenamiento de muestras pueden añadirse a esto cuando sea necesario.

Resultados

30 *Genotipificación*

35 La genotipificación se realizó para los 12 marcadores de la Tabla 2 sobre las 612 muestras de la Tabla 1. Uno de los marcadores, S0097, daba dificultades técnicas con la amplificación y/o genotipificación por PCR, lo que hacía imposible designar los tamaños de alelo con el software Genotyper® ni mediante intervención humana.

40 Los resultados de los genotipos para 303 muestras se usaron para definir los intervalos de categorías de alelos. Los 606 alelos procedentes de estos genotipos se clasificaron por tamaño (a partir del resultado del Genotyper®) y se representaron como se muestra en la Figura 1 para SW2623 y S0301.

45 Los intervalos de las categorías observadas de SW2623 son fácilmente interpretables con las etapas de 2 pares de bases entre los diferentes intervalos. Los puntos inicial y final de cada intervalo se extendieron en 10 pares de bases y a continuación se usaron como puntos de corte en la aplicación SAS de categorización de alelos.

50 S0301 se incluye en la presente para ilustrar un problema con este marcador. Entre los tamaños de alelo 249 y 255 hay observaciones en intervalos de 1 par de bases. Esto se observó también para otros pocos marcadores, en cuyo caso podía determinarse que dos observaciones dentro de 1 par de bases eran realmente el mismo alelo y podían categorizarse en el mismo intervalo. Por ejemplo, para TNFB, siempre puede registrarse una designación del Genotyper® de 161 ó 162 para un alelo 162 debido a que el 161 es sólo un "error" infrecuente del sistema. Para S0301, los Solicitantes no fueron tan afortunados ya que hay varios modos de concluir con una designación del Genotyper® de 249 (un alelo 249 real, un alelo 250 mal etiquetado o un heterocigoto 247/251) entre los que no puede distinguirse inequívocamente. Por lo tanto, el S0301 se ha retirado del análisis de paternidad. Los resultados del intervalo de categorías de alelos se listan en la Tabla 3.

55 Dos sementales de BS1 habían sido muestreados dos veces y por lo tanto 2 de las muestras (BVS19 y BVS21) se retiraban del análisis después de que se encontraran patrones genotípicos idénticos para los sementales 1 y 21 y para los sementales 2 y 19. Esto deja 610 muestras que han de usarse en el análisis de paternidad.

60 La proporción de genotipos ausentes al principio del análisis de paternidad era 2,4%. La mayoría de estos se debía a alelos que estaban fuera de los intervalos predefinidos. Estos resultados pueden controlarse individualmente y usarse para afinar los intervalos de categorías de alelos, pero esto no se ha hecho todavía. 2,4% ya es un porcentaje muy bajo y es improbable que las conclusiones se vean afectadas.

65

ES 2 343 243 T3

Análisis de paternidad

El propósito del experimento indicaba que había que realizar 3 pruebas, cuyos resultados están en la Tabla 4.

TABLA 4

Proporción de muestras procedentes de las pruebas 1, 2 y 3 (columnas) que podrían asignarse a progenitores del grupo de progenitores indicado en cada fila. Los resultados en cursiva negrita indican que se esperaba/deseaba una coincidencia. Los resultados subrayados indican que no se esperaban/deseaban coincidencias

	SU1			SU2			SISTEMA II		
	Prueba 1 Cerdos	Prueba 2 Reses muertas (piel)	Prueba 3 Carne (jamón)	Prueba 1 Cerdos	Prueba 2 Reses muertas (piel)	Prueba 3 Carne (jamón)	Prueba 1 Cerdos	Prueba 2 Reses muertas	Prueba 3 Carne
Sementales BS1	47/56	25/50	9/15	28/56	23/56	7/15	<u>13/50</u>	-	-
Madres SU1	54/56	38/50	11/15	<u>8/56</u>	<u>31/50</u>	<u>12/15</u>	<u>5/50</u>	-	-
Sementales BS1 + madres SU1	40/56	12/50	9/15	<u>0/56</u>	<u>3/50</u>	<u>0/15</u>	<u>0/50</u>	-	-
Madres SU2	<u>11/156</u>	<u>17/50</u>	<u>9/15</u>	56/56	28/50	13/15	<u>7/50</u>	-	-
Sementales BS1 + madres SU2	<u>0/56</u>	<u>1/50</u>	<u>0/15</u>	23/56	6/50	1/15	<u>0/50</u>	-	-

Para la prueba 1, los descendientes nacidos en cada una de las 3 granjas (56, 56 y 50, respectivamente) habían de cotejarse con progenitores candidatos listados en la columna 1 de la Tabla 4. Estos son los 21 sementales listados en la Tabla 1 así como las madres listadas en la Tabla 1 bajo cerdas a. Tomando SU1 y SU2 conjuntamente, 75 de 112 descendientes o 67% pueden cotejarse con un semental presente en BS1 en el momento del muestreo (resultados en la línea 1). En otras palabras, 33% de los descendientes eran engendrados por un verraco diferente. Esto se compara con un porcentaje de verracos sacrificados entre los apareamientos y el muestreo de 20%.

54 de los 56 descendientes en la SU1 se cotejan con una de las 14 cerdas de SU1 que se espera que los hayan producido y sólo uno de los 54 se asignó a una cerda diferente a la del registro (resultados en la línea 2). Todos los descendientes en SU2 pueden cotejarse con una de las 14 cerdas de SU2, todos menos 2 descendientes se asignaron a la cerda registrada como la madre. Hay un alto grado de éxito en la asignación del descendiente a la granja de cerdas correcta (resultados en la línea 4). Una desventaja de este resultado es la asignación de 11 cerdas SU1 y 8 cerdas SU2, respectivamente, a un descendiente del sistema equivocado. Además, 5 y 7 descendientes del sistema 2 tienen cerdas asignadas de SU1 y SU2, respectivamente.

La prueba más restrictiva es asignar tanto un semental como una madre a un descendiente. Esto se realizó asignando los sementales en primer lugar y subsiguientemente asignando las madres mientras se usa en semental asignado como un progenitor conocido (método como el sugerido en la documentación de Cervus). De este modo, la asignación satisfactoria de dos progenitores es siempre menor o igual a la proporción de descendientes con un semental asignado. Para descendientes de SU1, dos progenitores podrían asignarse a 40 de 56 descendientes (resultados en la fila 3) y para SU2 23 de 56 tenían dos progenitores asignados. En el sistema 2, ninguno de los descendientes tenía tanto un semental BS1 como una madre SU1 o SU2 asignados, como se esperaba y deseaba.

Las pruebas 2 y 3 requerían reses muertas, ijadas y jamones, muestreadas en la planta de matanza y registradas como procedentes de SU2 y SU1 para ser cotejadas con progenitores de esas dos granjas. En este caso, los progenitores candidatos son los 21 sementales BS1 más todas las cerdas (a y b) listadas en la Tabla 1. Debido al lapso de tiempo

ES 2 343 243 T3

más prolongado entre apareamientos que producían estos cerdos para matanza y el muestreo en BS1, se espera que un porcentaje menor de las reses muertas coincida con los sementales de BS1 que de los descendientes nacidos en SU1 y SU2. Se espera que el número limitado de madres muestreadas en SU2 y SU1 incluya sólo una proporción de las madres que producían los cerdos para matanza muestreados. Además, se muestrearon menos madres de SU2 en comparación con SU1, lo que se refleja en una proporción menor de cerdos para matanza procedentes de SU2 cotejados (28/50 frente a 38/50). Los resultados de la Tabla 4 apoyan estas expectativas. Una proporción bastante grande de cerdos para matanza se coteja con cerdas procedentes de la granja incorrecta (líneas 2 y 4) cuando solo se asignan madres. Cuando se asignan ambos progenitores, muy pocas reses muertas y ningún jamón se asignan a la fuente de granja incorrecta. No se realizó un análisis separado para las muestras de ijada. 10% de las muestras de ijada procedentes de cada granja se genotipificó y se comparó con sus muestras de piel correspondientes. No se encontraron discrepancias.

Conclusiones

Comenzando con el resultado más prometedor, 110 de 112 lechones podían cotejarse con al menos una cerda de la granja correcta. Esto muestra la exactitud de los marcadores en este proyecto ya que en la presente los Solicitantes tienen la mayor certeza acerca de haber muestreado todos los progenitores candidatos. Se sabe que al menos 5 sementales se sacrificaban entre los apareamientos y el muestreo del descendiente, lo que significa que no todos los sementales están incluidos en esta prueba. Cotejando las reses muertas con las cerdas de las dos granjas dentro del sistema, los Solicitantes saben que solo parte de las cerdas se muestreaban, 133 y 64 de 600, respectivamente. Además, la presencia de progenitores candidatos adicionales incrementa la posibilidad de una coincidencia aleatoria entre una res muerta y una cerda de la granja errónea (falsos positivos).

Los resultados obtenidos permiten predecir el poder del sistema de rastreabilidad según se aplica en la presente en este sistema experimental, y hacer predicciones de su comportamiento en otros sistemas (mayores).

Efecto del sistema actual

El principal parámetro en un sistema de rastreabilidad es la probabilidad de exclusión (P_e).

Esta es la probabilidad de que un grupo de marcadores indiquen que un progenitor candidato elegido aleatoriamente no sea el progenitor real de un descendiente. Esto se explica del modo más fácil para una situación con un solo marcador con 2 alelos (Tabla 5). Hay 2 combinaciones progenitor-descendiente, marcadas en cursiva, que excluirán a un candidato como este progenitor del descendiente. La frecuencia con la que esto se produce para un par aleatorio de 2 animales es $2/16$ o $0,125$. Por lo tanto, la probabilidad de exclusión de este marcador es $12,5\%$. Obviamente, este marcador de 2 alelos no es muy informativo, que es por lo que se usan los marcadores tipo microsatélite. Las probabilidades de exclusión cuando se usan 1, 2, etc. hasta 10 marcadores se dan en la Tabla 6.

TABLA 5

Ejemplo de paternidad con genotipos en negrita y frecuencias como fracciones

		<u>progenitor candidato</u>		
		<i>1/4</i>	<i>1/2</i>	<i>1/4</i>
<u>descendientes</u>		11	12	22
<i>1/4</i>	11	<i>1/16</i>	<i>1/8</i>	<i>1/16</i>
<i>1/2</i>	12	<i>1/8</i>	<i>1/4</i>	<i>1/8</i>
<i>1/4</i>	22	<i>1/16</i>	<i>1/8</i>	<i>1/16</i>

ES 2 343 243 T3

TABLA 6

Probabilidades de exclusión y número medio de progenitores candidatos asignados u observados

		Pe primer progenitor	Pe segundo progenitor	Nº madres previstas asignado por lechón	Nº madres observadas asignado por lechón
5	1	0,431	0,608	16,4	11,2
	2	0,607	0,798	11,6	9,7
	3	0,753	0,909	7,7	6,7
	4	0,879	0,971	4,3	4,4
15	5	0,931	0,989	2,9	3,4
	6	0,95	0,994	2,4	2,7
	7	0,964	0,996	2,0	2,4
	8	0,978	0,998	1,6	1,8
	9	0,982	0,998998	1,5	1,7
20	10	0,988	0,999532	1,3	1,4

El valor Pe para el primer progenitor se usa para predecir el número medio de madres asignadas, de 28 candidatos, a cada lechón. Los valores predichos se mantienen bien cuando se comparan con los valores observados en la última columna. El valor Pe para el segundo progenitor se usará para hacer predicciones para sistemas más grandes posteriormente. Este Pe para el segundo progenitor es la probabilidad de excluir que un animal aleatorio sea el segundo progenitor cuando se conoce el genotipo del primer progenitor.

Debido a que los valores predichos siguen tan estrechamente los resultados observados, los Solicitantes pueden hacer predicciones para un sistema de rastreabilidad mayor. Un sistema mayor significa que hay más progenitores candidatos. Cuanto mayor sea el número de progenitores candidatos, menor es la probabilidad de que puedan excluirse todos (menos uno) de ellos con un número de marcadores dado. Si el Pe de un sistema de marcadores es 95%, entonces eso significa que cada falso candidato tiene un 95% de posibilidades de ser excluido. También significa que 1 en 20 candidatos será asignado (no excluido) como un posible progenitor, de modo que en un sistema con 10.000 cerdas puede pararse con 500 progenitores candidatos. Para calibrar el valor de un grupo de marcadores en un sistema específico, los Solicitantes definen Pe_x , donde x es el número de progenitores candidatos.

TABLA 7

Valores de Pe_x para sistemas Verispeq que emplean entre 5 y 50. Los valores de Pe para 40 y 50 marcadores (primer progenitor) o para 20 y 30 marcadores (segundo progenitor) se estiman, otros se calculan a partir de datos reales

	Nº de marcadores	Pe	Pe_x primer progenitor							
			50	100	600	10.000	20.000	30.000	40.000	50.000
45	5	0,931	0,03	0	0	0	0	0	0	0
	10	0,988	0,55	0,30	0	0	0	0	0	0
	15	0,999195	0,96	0,92	0,62	0	0	0	0	0
50	20	0,999865	0,99	0,99	0,92	0,26	0,07	0,02	0	0
	30	0,999998	0,99	0,99	0,99	0,98	0,96	0,94	0,92	0,90
	40	0,9999999	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
	50	0,99999999	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
55			Pe_x segundo progenitor							
	Nº de marcadores	Pe	50	100	600	10.000	20.000	30.000	40.000	50.000
60	5	0,989	0,58	0,33	0	0	0	0	0	0
	10	0,999532	0,98	0,95	0,76	0,01	0	0	0	0
	15	0,999995	0,99	0,99	0,99	0,95	0,90	0,86	0,82	0,78
65	20	0,999999	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,97	0,96	0,95
	30	0,9999999	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99

ES 2 343 243 T3

Un sistema de marcadores con un valor de Pe_{500} de 95% puede excluir todos los candidatos de un grupo de 500, el 95% del tiempo. A menudo, se deseará excluir sólo 499 de 500 pero los resultados serán muy similares y la coincidencia un poco más fácil si se realizan los cálculos para excluir todos los candidatos. Para un Pe de 95%, el $Pe_{10} = (0,95)^{10}$ o 60% pero el $Pe_{10,000}$ es un número muy cercano a cero (alrededor de $1,7 \cdot 10^{-233}$). Los Pe_x (Tabla 7) calculados en la presente se basan en los valores de Pe reales observados en este experimento.

El valor de Pe_{14} para 10 marcadores es 84%, lo que significa que los Solicitantes esperan que a 16% de los lechones se les asigne una madre de la granja errónea. Esto está cerca del 12% observado de los lechones del sistema II que tienen una cerda asignada de SU1 o SU2 y también cerca del 17% de lechones en SU1 y SU2 que tenían una cerda asignada de la granja alternativa (resultados en la Tabla 3). Un valor para $1-Pe_{21}$ de 22% está de nuevo cerca del 26% observado de cerdos en el sistema II que tenían asignado un semental de BS1.

Se pretende que todas estas modificaciones y variaciones obvias se incluyan dentro del alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones adjuntas.

TABLA 3

Intervalos de categorías de alelos usados en análisis de rastreabilidad

	número de alelos	observado	intervalo	longitud del intervalo	punto medio del intervalo	distancia observada al siguiente alelo	intervalo definido (=observado + o - 0,10)	distancia definida al siguiente alelo		
25	S0226	185	185,03	185,78	0,75	185,41	129	184,93	185,88	1,09
		187	187,07	187,79	0,72	187,43	5,41	186,97	187,89	5,21
		194	193,2	193,88	0,68	193,54	5,35	193,1	193,98	5,15
		200	199,23	199,92	0,69	199,58	5,43	199,13	200,02	5,23
		206	205,35	205,92	0,57	205,64	1,77	205,25	206,02	1,57
		208	207,69	207,88	0,19	207,79	7,58	207,59	207,98	7,38
		216	215,46	216,07	0,61	215,77		215,36	216,17	
35	SW2 623	125	124,97	125,23	0,26	125,10	11,55	124,87	125,33	11,35
		137	136,78	137,14	0,36	136,96	1,62	136,68	137,24	1,42
		139	138,76	139,08	0,32	138,92	1,91	138,66	139,18	1,71
		141	140,99	140,99	0	140,99	2,04	140,89	141,09	1,84
		143	143,03	143,37	0,34	143,20	1,76	142,93	143,47	1,56
40	SW72	145	145,13	145,49	0,36	145,31		145,03	145,59	
		103	102,91	103,37	0,46	103,14	7,41	102,81	103,47	7,21
		111	110,78	111,68	0,9	111,23	1,33	110,68	111,78	1,13
		113	113,01	113,78	0,77	113,40	1,26	112,91	113,88	1,06
		115	115,04	115,83	0,79	115,44	3,85	114,94	115,93	3,65
45	SW24	120	119,68	120	0,32	119,84		119,58	120,1	
		100	99,75	100	0,25	99,875	1,85	99,65	100,1	1,65
		102	101,85	102,03	0,18	101,94	4,24	101,75	102,13	4,04
		106	106,27	106,36	0,09	106,32	1,16	106,27	106,46	0,96
		108	107,52	108,43	0,91	107,98	5,51	107,42	108,53	5,31
50	TNFB	114	113,94	114,75	0,81	114,35	1,55	113,84	114,85	1,35
		116	116,3	116,64	0,34	116,47	3,63	116,2	116,74	3,43
		120	120,27	120,65	0,38	120,46	3,79	120,17	120,75	3,59
		125	124,44	124,64	0,2	124,54	1,84	124,34	124,74	1,64
		127	126,48	126,79	0,31	126,64		126,38	126,89	
		162	161,29	162,95	1,66	162,12	1,32	161,19	163,05	1,12
		165	164,27	165,45	1,18	164,86	1,82	164,17	165,55	1,62
60	TNFB	168	167,27	168,47	1,2	167,87	5,58	167,17	168,57	5,38
		174	174,05	174,24	0,19	174,15	2,93	173,95	174,34	2,73
		177	177,17	177,17	0	177,17	2,05	177,07	177,27	1,85
		180	179,22	179,86	0,64	179,54	5,05	179,12	179,96	4,85
		186	184,91	186,36	1,45	185,64	1,68	184,81	186,46	1,48
		189	188,04	189,09	1,05	188,57	10,61	187,94	189,19	10,41
		200	199,7	200,69	0,99	200,20		199,6	200,79	

ES 2 343 243 T3

	número de alelos	observado	intervalo	longitud del intervalo	punto medio del intervalo	distancia observada al siguiente alelo	intervalo definido {=observado + o - 0,10}	distancia definida al siguiente alelo		
5	SW122	117	116,78	117,04	0,26	116,91	2,08	116,68	117,14	1,88
10		119	119,12	119,12	0	119,12	1,47	119,02	119,22	1,27
		121	120,59	121,48	0,89	121,035	1,51	120,49	121,58	1,31
		123	122,99	123,48	0,49	123,235	1,48	122,89	123,53	1,28
		125	124,96	125,57	-0,61	125,265	1,42	124,86	125,67	1,22
15		127	126,99	127,71	0,72	127,35	1,67	126,89	127,81	1,47
		130	129,38	129,87	0,49	129,625	1,7	129,28	129,97	1,5
		132	131,57	131,83	0,26	131,7		131,47	131,93	
20	SW2411	193	192,94	192,94	0	192,94	7,32	192,84	193,04	7,12
		207	200,26	200,95	0,69	200,605	3,08	200,16	201,05	2,88
		204	204,03	204,6	0,57	204,315	3,24	203,93	204,7	3,04
25		208	207,84	208,58	0,74	208,21	1,14	207,74	208,68	0,94
		210	209,72	210,4	0,68	210,06	1,42	209,62	210,5	1,22
		212	211,82	212,1	0,28	211,96	15,19	211,72	212,2	14,99
		227	227,29	227,29	0	227,29		227,19	227,39	
30	SW857	146	145,13	146,13	1	145,63	5,72	145,03	146,23	5,52
		152	151,85	152,2	0,35	152,025	1,16	151,75	152,3	0,96
35		154	153,36	154,3	0,94	153,83	1,38	153,26	154,4	1,18
		156	155,68	156,35	0,67	156,015	1,41	155,58	156,45	1,21
		158	157,76	158,37	0,61	158,065	1,16	157,66	158,47	0,96
		160	159,53	160,38	0,85	159,955	1,68	159,43	160,48	1,48
40		162	162,06	162,69	0,63	162,375		161,96	162,79	
	SW1430	167	167,07	167,71	0,64	167,39	1,35	166,97	167,81	1,15
		169	169,06	169,61	0,55	169,335	2,21	168,96	169,71	2,01
45		172	171,82	172,47	0,65	172,145	0,63	171,32	172,47	0,63
		173	173,1	173,45	0,35	173,275	3,59	173,1	173,55	3,39
		177	177,04	177,04	0	177,04		176,94	177,14	
50	SW936	100	100	100,55	0,55	100,275	1,45	99,9	100,65	1,25
		102	102	102,69	0,69	102,345	1,33	101,9	102,79	1,13
		104	104,02	104,65	0,63	104,335	5,64	103,92	104,75	5,44
55		111	110,29	110,94	0,65	110,615	5,52	110,19	111,04	5,32
		117	116,46	117,11	0,65	116,785	1,43	116,36	117,21	1,23
		119	118,54	119,18	0,64	118,86		118,44	119,28	

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de rastreo de un producto animal hasta su unidad de producción o granja de origen, que comprende:
genotipificar una muestra de dicho producto animal utilizando un sistema basado en marcadores de DNA para obtener
información de genotipificación; comparar la información de genotipificación de dicho producto animal con una base
de datos de referencia, **caracterizada** porque dicha base de datos de referencia consiste en perfiles de marcadores
de DNA de animales progenitores únicos para una unidad de producción o granja, o para diferentes unidades de
10 producción o granjas; analizar dicha información de genotipificación con dicha referencia para determinar una unidad
de producción o granja de origen para dicho producto.

15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha genotipificación se selecciona del grupo que
comprende: microsátélites, polimorfismos de un solo nucleótido, polimorfismos de longitud de fragmento amplificada
y deleciones e inserciones de todo, o parte de, dicho perfil de la secuencia de DNA.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sistema basado en marcadores de DNA comprende
la identificación de entre 10 y 100 marcadores tipo microsátélite para identificar que un producto animal seleccionado
se origine desde dentro o desde fuera de la unidad de producción o granja de origen controlada.

20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho sistema basado en marcadores de DNA compren-
de además la identificación de entre 20 y 50 marcadores tipo microsátélite para identificar que un producto animal
seleccionado se origine desde dentro o desde fuera de la unidad de producción o granja de origen controlada.

25 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha información de muestra contiene información
seleccionada del grupo que comprende: fecha de la muestra, localización del animal, estado del animal, información
sobre el transporte de la muestra e información sobre el almacenamiento de la muestra.

30 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho producto animal es una especie de animal de
granja.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho animal se selecciona del grupo que consiste en:
ganado bovino, ganado porcino, aves de corral, ganado ovino, cabras, peces, mariscos y camarones.

35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la genotipificación se selecciona de datos que se refieren
a uno o más de los siguiente: mapeo genético, antecedentes genéticos o cribado genético relacionados con dicho animal
progenitor o dicha muestra de animal progenitor.

40

45

50

55

60

65

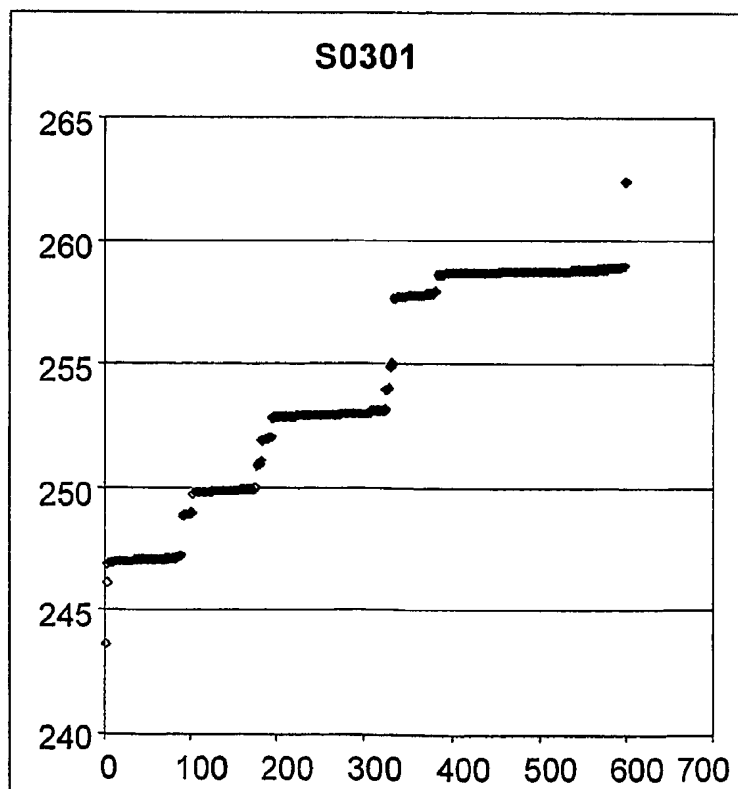
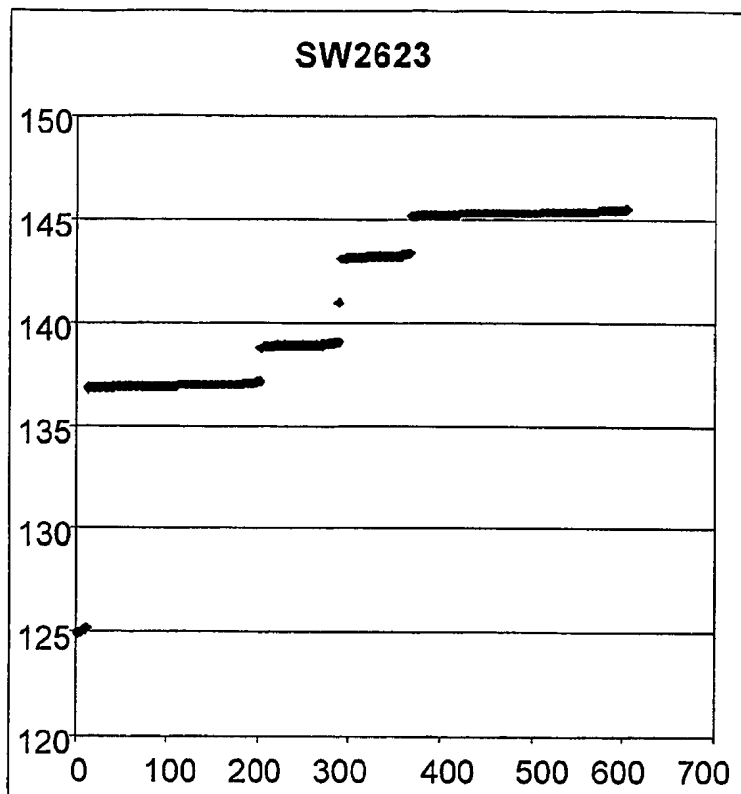


FIGURA 1