



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Nutrición y Seguridad Alimentaria

Desarrollo de métodos moleculares para la detección de
fraudes alimentarios.

Autor:

Miriam Aldeguer García

Director:

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

Murcia, julio de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Nutrición y Seguridad Alimentaria

Desarrollo de métodos moleculares para la detección de
fraudes alimentarios.

Autor:

Miriam Aldeguer García

Director:

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

Murcia, julio de 2017



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DE LO/S DIRECTOR/ES DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández, como Director de la Tesis Doctoral titulada “desarrollo de métodos moleculares para la detección de fraudes alimentarios” realizada por D^a. Miriam Aldeguer García en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 07 de julio de 2017

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer la realización de esta tesis, en primer lugar y por el tiempo dedicado, por su positividad y por su pasión por la investigación a mi director, el Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández, quien ha sido fundamental para terminar este trabajo por sus ánimos en los últimos momentos y por ser pieza imprescindible en transmitirme los conocimientos que he aplicado en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. D^a. Estrella Núñez Delicado, que hace ya algunos años me animó para encauzar, ahora lo sé, lo que sería mi vida laboral formando parte del laboratorio de Seguridad Alimentaria del Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación, donde aprendí tanto y conocí a gente maravillosa y a unos excepcionales profesionales, que aún tengo la suerte de que formen parte de mi vida, Jose Rex, M^a Elena, Isabel, María, Tere, Victoria, Ana y Gloria, a todas gracias por esos años.

Gracias a la UCAM por hacerme formar parte de ella y en especial a la Cátedra de Fisiología del Ejercicio por su acogida, al Dr. D. F. Javier López Román por haberme enseñado tantas cosas y a todos mis compañeros/as de laboratorio con quienes, codo con codo, hemos trabajado para tantos estudios. A Fulgencio, Antonio, Maysa e Isabel, gracias por los buenos momentos en el Departamento.

Quisiera dedicar este trabajo a mis padres, mis tres hermanos y mis sobrinos, pues son ellos los que dan el toque de sentido a esta vida que va tan rápido y que en ocasiones es tan difícil de comprender.

Carlos y Adriana os dejo para el final, sin embargo, sois lo primero en mi corazón, esta tesis también es para vosotros. Mi amor y mi pitufina, que todo lo que nos quede por vivir sea siempre juntos. Os quiero.

"Sólo existe una manera de aprender y es a través de la acción". El Alquimista (Paulo Coelho).

ÍNDICE GENERAL

SIGLAS Y ABREVIATURAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	19
ÍNDICE DE TABLAS	21
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	31
1.1. EL RIESGO ALIMENTARIO Y SU PERCEPCIÓN	33
1.2. EFECTOS ADVERSOS DE ORIGEN ALIMENTARIO	34
1.3. SUSTANCIAS QUE AMENAZAN LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS.....	35
1.3.1. Componentes intrínsecos	37
1.3.2. Microorganismos	38
1.3.3. Contaminantes abióticos.....	43
1.3.4. Nuevos terrores, los organismos modificados genéticamente.....	43
1.3.5. Fraudes alimentarios.....	54
1.4. ETIQUETADO Y TRAZABILIDAD DE ALIMENTOS	57
1.5. METODOLOGÍAS DISPONIBLES PARA COMBATIR EL FRAUDE	64
1.5.1. Métodos inmunoquímicos.....	66
1.5.2. Métodos genéticos	75
1.6. METODOLOGÍAS BASADAS EN LA AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES.....	77
1.6.1. Diseño de cebadores y sondas	80
1.6.2. Extracción de ADN molde.....	82
1.6.3. Componentes clave de la reacción de PCR.....	84
1.6.4. PCR a tiempo final.....	88
1.6.5. PCR a tiempo real	92
1.6.6. Agentes que se intercalan en la molécula de ADN.....	95
1.6.7. Sondas de hidrólisis.....	97
1.7. CUANTIFICACIÓN.....	99
1.7.1. Cuantificación absoluta	102
1.7.2. Cuantificación relativa.....	104
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	109

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	115
3.1. EXPERIENCIA 1. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES CÁRNICAS EN ALIMENTOS PROCESADOS MEDIANTE qPCR.....	117
3.1.1. Muestras de carne.....	117
3.1.2. Extracción de ADN.....	119
3.1.3. PCR en tiempo real.....	119
3.1.4. Cuantificación de especies cárnicas	121
3.1.5. Digestión de ADN	122
3.1.6. Detección de especies cárnicas por inmunoensayo	123
3.2. EXPERIENCIA 2. DETECCIÓN MANDARINA EN ZUMO DE NARANJA MEDIANTE qPCR MULTIPLEX.....	125
3.2.1. Muestras de naranja y mandarina.....	126
3.2.2. Extracción de ADN.....	126
3.2.3. Secuenciación de ADN.....	127
3.2.4. Detección y cuantificación de ADN	128
3.3. EXPERIENCIA 3. DETECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL TRANSGÉNICO (P-35S Y T-NOS) MEDIANTE PCR EN ALIMENTOS SUSCEPTIBLES DE CONTENER MATERIAL VEGETAL.....	131
3.3.1. Reactivos	131
3.3.2. Equipos.....	132
3.3.3. Condiciones ambientales y preparación de la muestra.....	132
3.3.4. Extracción de ADN.....	133
3.3.5. Cuantificación de ADN.....	137
3.3.6. Amplificación de ADN por PCR	139
3.3.7. Visualización de amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa	142
3.3.8. Precauciones y recomendaciones generales. Metodología de trabajo.....	145
CAPÍTULO IV: IDENTIFICACIÓN DE CARNES POR qPCR.....	151
4.1. ESPECIFICIDAD DE LOS DETECTORES	153
4.2. LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS DETECTORES	154
4.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PCR E INMUNOENSAYO.....	157

4.4. CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES UTILIZANDO MATRIZ DE REFERENCIA.....	158
4.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA FRAGMENTACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN.....	161
CAPÍTULO V: IDENTIFICACIÓN DE CÍTRICOS POR qPCR	167
5.1. IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN NUCLEÓTIDOS ENTRE ESPECIES PRÓXIMAS.....	169
5.2. EVALUACIÓN DEL ENSAYO DE qPCR MULTIPLEX.....	170
5.3. DETECCIÓN DE MANDARINA A PARTIR DE C_{Tc}	172
5.4. DETECCIÓN DE MANDARINA EN ZUMOS DE NARANJA	174
5.5. DETECCIÓN DE MANDARINA EN ZUMOS COMERCIALES	175
5.6. DETECCIÓN DE MANDARINA CON EL SISTEMA MULTIPLEX	177
CAPÍTULO VI: DETECCIÓN DE OMG EN ALIMENTOS Y PIENSOS.....	183
6.1. VERIFICACIÓN DE LOS CONTROLES	184
6.1.1. Verificación de los controles positivos	184
6.1.2. Detección del promotor	186
6.1.3. Detección del terminador	186
6.2. VALIDACIÓN DEL KIT EXTRAGÉN ALIMENTOS.....	189
6.2.1. Procedimiento para el estudio de la repetibilidad.....	190
6.2.2. Procedimiento para el estudio de la reproducibilidad.....	190
6.2.3. Probabilidad de error de primera especie a utilizar en los tests de hipótesis.....	191
6.2.4. Elección de los valores de m y n.....	192
6.2.5. Elección de los valores de corte para el coeficiente de variación.....	195
6.2.6. Resultados de la validación del kit Extragen.....	196
6.3. VALIDACIÓN DEL KIT AUTENTIGEN GMO SCREEN	201
6.3.1. Selección del número total de ensayos k.....	201
6.3.2. Resultados de la validación del kit Autentigen.....	202
6.4. VALIDACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN PARA NUEVAS MATRICES	205
6.5. PRUEBAS DE RECUPERACIÓN PARA LA VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN	210
6.5.1. Análisis estadístico aplicado a las pruebas de recuperación.....	212

6.5.2. Protocolo de extracción de ADN para alimentos encuadrados en la Categoría 2.....	215
6.5.3. Protocolo de extracción de ADN para alimentos encuadrados en la Categoría 13b	216
6.5.4. Pruebas de inhibición.....	218
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES.....	223
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	227

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
BSA: Albúmina de suero bovino
Bt: Bacillus thuringiensis
CaMV: Virus del mosaico de la coliflor
CEx: Control de extracción en un proceso de PCR
CI: Control de inhibición en un proceso de PCR
CN: Control negativo en un proceso de PCR
Ct: Número de ciclo en el cual la muestra alcanza un nivel de fluorescencia umbral (threshold cycle, en versión anglosajona)
DDA: Dosis diaria admisible
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato
E: Eficiencia de la reacción de PCR o el número de copias medio de producto de reacción por ciclo de PCR
EBB: Encefalopatía Espongiforme Bovina
EEUU: Estados Unidos de América
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del acrónimo inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EPA: Agencia para la protección del Medio Ambiente de Estados Unidos
ETA: Enfermedades transmitidas por los alimentos
FAO: Organización mundial para la agricultura y la alimentación
FC: Zumo procedente de concentrado
FDA: Food and drug administration
FRET: Fenómeno de la transferencia de energía de fluorescencia por resonancia
FTIR: Transformada de Fourier (del inglés Fourier transform infrared)
GC: Cromatografía de gases
GC-MS: Cromatografía de gases-espectrometría de masas

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés High-Performance Liquid Chromatography)

IEF: Isoelectroenfoque

IMIDA: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

IAs: Inmunoensayos

IgGs: Inmunoglobulinas del tipo G

IP: Identidad preservada

ISAAA: Instituto especializado en el seguimiento del uso de los OMG

JRC: Joint Research Center, Centro Común de Investigación de la Comunidad Europea

KLH: Proteína del molusco *Megathura crenulata*

LC-MS/ MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LINES: Retrotransposones de ADN nuclear con secuencias repetidas largas (Long Interspersed Nuclear Elements, en versión anglosajona)

LOD: Límite de detección

mAbs: Anticuerpos monoclonales

MALDI-TOF: desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a detector de iones (de sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization – Time Of Flight)

MBM: Piensos o harinas de carne y hueso (Meat and Bone Meal, en versión anglosajona)

MGB: Afinidad por el surco menor del DNA (Minor Groove Binding, en versión anglosajona)

Molecular Beacons: Sondas con estructura tipo horquilla

NFC: Zumo no procedente de concentrado (juice not from concentrate, en versión anglosajona)

NFQ: Quencher oscuro no fluorescente

NIR: Espectroscopia infrarroja cercana (del inglés Near-Infrared Spectroscopy)

NOS: Secuencia terminadora procedente de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*

OMG: Organismos modificados genéticamente

OCU: Organización de consumidores y usuarios

OMS: Organización mundial de la salud

P-35S: Secuencia promotora procedente del virus del mosaico de la coliflor

pAbs: Anticuerpos policlonales

PAGE-SDS: Electroforesis realizada en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

pb: Par de bases

PCBs: Bifenilos policlorados

PCR: Reacción de amplificación de la polimerasa en cadena (del inglés polymerase chain reaction)

PCR-RFLP: Reacción de amplificación de la polimerasa en cadena seguida de digestión de los productos de DNA con enzimas de restricción (del inglés Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism)

qPCR: PCR en tiempo real (del inglés quantitative polymerase chain reaction)

QUID: Etiquetado cuantitativo de ingredientes (del inglés Quantitative Ingredient Declaration)

RASFF: Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos

RC: Reactividad cruzada

RD: Intervalo de trabajo en un inmunoensayo cuantitativo

RIA: Radioinmunoensayo

RM: Relación molar

SCF: Comité científico para alimentos

SINES: Secuencias repetidas cortas en DNA nuclear (del inglés Short Interspersed Nuclear Elements)

SNIF-NMR[®]: Técnica que utiliza la resonancia magnética nuclear logrando la identificación mediante comparación de perfiles atómicos (del inglés Site-specific Natural Isotopic Fractionation Nuclear Magnetic Resonance)

SNP: Mutaciones puntuales que afectan a un solo nucleótido

Taq: Enzima polimerasa obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*

T_m: Temperatura de fusión o melting

UE: Unión Europea

μM: Micromolar

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. <i>Mecanismo de transformación en vegetales con Agrobacterium</i>	46
Figura I.2. <i>Transformación genética de plantas a través del bombardeo con microproyectiles</i>	47
Figura I.3. <i>Área global de cultivos biotecnológicos desde 1996 hasta 2014 (millones de hectáreas)</i>	48
Figura I.4. <i>Tasas de adopción mundial de los principales cultivos biotecnológicos (millones de hectáreas)</i>	49
Figura I.5. <i>Evolución de las hectáreas de maíz Bt cultivadas en España</i>	50
Figura I.6. <i>Técnicas a emplear para la detección de fraudes alimentarios</i>	65
Figura I.7. <i>Estructura básica de las inmunoglobulinas G (IgGs)</i>	67
Figura I.8. <i>Curva sigmoide típica dosis-respuesta</i>	72
Figura I.9. <i>Perfil de temperaturas característico de una PCR</i>	87
Figura I.10. <i>Proceso de PCR</i>	89
Figura I.11. <i>Amplificación exponencial del ADN durante la PCR</i>	90
Figura I.12. <i>Elementos genéticos introducidos en los OMG</i>	90
Figura I.13. <i>Construcciones genéticas específicas de distintos OMG</i>	91
Figura I.14. <i>Representación esquemática de las unidades excitación y detección de un termociclador comercial que dispone de seis canales</i>	94
Figura I.15. <i>Amplificación mediante SYBR® Green</i>	96
Figura I.16. <i>Comportamiento de las sondas de hidrólisis tipo TaqMan® en la PCR en tiempo real</i>	98
Figura I.17. <i>Representación esquemática de las diferentes etapas en la detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real</i>	100
Figura IV.1. <i>Correlación lineal obtenida en la amplificación de ADN con cada uno de los detectores específicos: ternera (A), pollo (B), cerdo (C) y pavo (D)</i>	154
Figura IV.2. <i>Correlación obtenida tras la amplificación de ADN de mezclas binarias</i>	156
Figura IV.3. <i>Valores de señal obtenidos por inmunoensayo para muestras de la serie F</i>	158
Figura IV.4. <i>Cuantificación de cerdo en mezclas binarias cerdo/ternera (50:50), utilizando estándares de matriz para construir la recta de calibrado</i>	159

Figura IV.5. Amplificación de ADN por qPCR en muestras sometidas a digestión.....	163
Figura V.1. Sistemas de reconocimiento de ADN de naranja y mandarina.....	171
Figura V.2. Especificidad del sistema de reconocimiento de ADN de naranja y mandarina	171
Figura V.3. Cuantificación de mandarina en mezclas de zumo de naranja/mandarina	178
Figura VI.1. Imágenes de electroforesis sobre una muestra de harina de maíz y otra de soja, aplicando el protocolo de PCR optimizado	187
Figura VI.2. Curvas de potencia para la comparación de varianzas	194
Figura VI.3. Visualización de las cinco réplicas de ADN amplificado de harina de maíz obtenidas por el operario 1. Calle 1: Marcador 100 pb; Calles: 2, 3, 4, 7 y 8: muestra de harina de maíz (cinco réplicas); Calle 5: Cex; Calle 6: Control de PCR.....	198
Figura VI.4. Probabilidad de validación del laboratorio en función de su probabilidad real de amplificación.....	204
Figura VI.5. Visualización de los amplificados obtenidos por ambos operarios utilizando maíz G21 (0,1%) como material de referencia certificado	205
Figura VI.6. Esquema para la validación de la extracción de ADN para nuevas matrices.....	206
Figura VI.7. Esquema para la validación de las pruebas de recuperación	211
Figura VI.8. Tablas de distribución de t con gl grados de libertad	213
Figura VI.9. Esquema a seguir para realizar las pruebas de inhibición	219

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla III.1. <i>Cantidades de carne de cada especie objeto de análisis en las mezclas</i>	118
Tabla III.2. <i>Cebadores y sondas oligonucleotídicas</i>	120
Tabla III.3. <i>Variedades de naranja y mandarina y código de la secuencia utilizada.....</i>	127
Tabla III.4. <i>Tipo y volumen necesario de reactivos en el coctel de reacción.....</i>	141
Tabla III.5. <i>Condiciones de PCR. Ciclos térmicos y tiempos en el proceso de amplificación ..</i>	142
Tabla IV.1. <i>Relación (R) entre de la señal obtenida con los detectores para las cuatro especies sobre ADN específico y no específico</i>	153
Tabla IV.2. <i>Limite de detección de los detectores específicos en mezclas binarias ternera/cerdo y pavo/pollo.....</i>	157
Tabla V.1. <i>Respuesta lineal y eficiencia del ensayo de qPCR utilizando detectores de naranja y mandarina.....</i>	172
Tabla V.2. <i>Diferencias en los valores de C_T obtenidos con los detectores de naranja y mandarina por qPCR utilizando como ADN molde diferentes porcentajes de mandarina en mezclas binarias con naranja</i>	173
Tabla V.3. <i>Sensibilidad del ensayo multiplex para la detección de mandarina en zumo de naranja utilizando un ΔC_{Tc} de 10 ciclos como cut-off.....</i>	175
Tabla VI.1. <i>Tamaño esperado de los fragmentos en la electroforesis</i>	185
Tabla VI.2. <i>Estudio estadístico de las distintas opciones posibles de valores de m y n, a través de la potencia, para detectar diferencias entre ambos operarios.....</i>	192
Tabla VI.3. <i>Cantidades de muestra y volumen de tampón de lisis</i>	196
Tabla VI.4. <i>Evaluación del efecto matricial utilizando cinco matrices y cinco réplicas por operario.....</i>	197
Tabla VI.5. <i>Valores de los parámetros estadísticos correspondientes al test de medias y varianzas realizados para determinar la reproducibilidad del kit Extragen</i>	200
Tabla VI.6. <i>Cantidades de muestra, volumen de tampón de lisis e intervalo de concentraciones de ADN para la validación de nuevas matrices incluidas en el CODEX</i>	209
Tabla VI.7. <i>Rendimientos de ADN esperados empleando el kit Extragen (manual del kit aportado por Sistemas Genómicos, S.L), en función del tipo de alimento</i>	210

TESIS DOCTORAL DE

D^a. Miriam Aldeguez García

DIRECTOR

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

TÍTULO

“Desarrollo de métodos moleculares para la detección de fraudes alimentarios”

RESUMEN

Las fuertes crisis alimentarias sufridas por la sociedad europea originadas por enfermedades transmitidas por alimentos, condicionaron que todos los sistemas de seguridad y salud existentes fueran puestos en duda, con repercusiones sin precedentes en todos los sectores, demandando a las autoridades garantías en cuanto a la calidad, seguridad y veracidad del etiquetado. A consecuencia de ello, en los últimos años se ha evidenciado un interés creciente por determinar el origen y contenido de los productos destinados al consumo, con especial énfasis en las especies animales y vegetales declaradas o no en los productos elaborados, requiriendo para cumplir con los objetivos reguladores y proteccionistas, el empleo de métodos sensibles, selectivos, rápidos, automatizables, económicos y fáciles de usar.

La identificación y cuantificación de especies en alimentos se aborda en la práctica mediante la detección de proteínas y/o secuencias de ADN específicas de especie, presentando esta última ciertas ventajas frente a los métodos basados en proteínas. Entre las metodologías génicas, una de las opciones más versátiles se centra en la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo final para la identificación de ADN (*screening*) y a tiempo real (qPCR), para determinar y cuantificar el ADN presente en muestras complejas. De las diferentes variantes metodológicas de la qPCR destacan los sistemas basados en el empleo de sondas fluorescentes específicas. Desde hace algunos años se emplea una variante de las sondas fluorescentes de hidrólisis habituales, que presenta mayor afinidad por el

surco menor del ADN (MGB) para determinaciones de polimorfismos en aplicaciones biomédicas, que pueden ser de aplicación en la identificación y cuantificación de especies en alimentos, permitiendo amplificar incluso en alimentos procesados, moléculas de ADN muy fragmentado, y detectar al mismo tiempo variaciones entre especies filogenéticamente próximas y entre variedades dentro de una misma especie, mediante el análisis de polimorfismos de un único nucleótido.

Así, en esta tesis se han desarrollado detectores adecuados para diferenciar mamíferos (ternera, cerdo) y aves (pavo, pollo) en muestras frescas y procesadas, utilizando como estándar de referencia para normalizar las concentraciones, los valores de C_T obtenidos para una mezcla 50:50 de vaca/cerdo o pavo/pollo, reduciendo así el número de estándares requeridos. Esta aproximación permite obtener un valor realista de la diferencia en el número de copias de la secuencia diana por unidad de masa del material empleado para cada especie, pudiendo normalizar de forma sencilla, los datos obtenidos mediante qPCR a porcentajes de material de cada especie en las muestras. Estos materiales de referencia son adecuados para el análisis de alimentos procesados, ya que se pueden someter al mismo tratamiento que las muestras a ensayar.

Además, se ha abordado el problema de la discriminación de especies filogenéticamente muy próximas o variedades dentro de una misma especie, abordando la diferenciación de naranja y mandarina en zumos. El método puesto a punto se basa en la utilización de un juego de cebadores comunes para las dos especies y dos sondas TaqMan[®] MGB que se diferencian en una sola base, correspondiente al polimorfismo que identifica cada especie. Los resultados obtenidos evidencian que el método de qPCR permite establecer un límite de detección útil para mandarina, diferenciando entre ingrediente y contaminación; si bien, se aconseja que el procedimiento de análisis vaya acompañado de suficientes reacciones control con materiales de referencia para evitar errores de cuantificación debido a la variabilidad asociada a las medidas.

También se llevó a cabo la validación de un protocolo de PCR, en todas las matrices alimentarias que aparecen en el *Codex Alimentarius* y piensos, mostrando un LOD de 0,1% frente a material de referencia certificado, para la identificación de las secuencias P35S y TNOS.

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis resaltan la importancia del empleo de materiales de referencia adaptados a la matriz a analizar, tanto en aplicaciones cualitativas como cuantitativas, a diferencia de otras propuestas que requieren la elaboración de una colección de muestras de referencia con distintas proporciones de la especie a detectar en la mezcla, obteniendo datos fiables utilizando una única muestra de referencia con contenido conocido de las especies a analizar (50% de cada una). Esta aproximación puede simplificar la puesta a punto y validación de métodos de análisis particularizados para cada tipo de matriz, facilitando la introducción y consolidación de los sistemas de identificación genética en alimentos.

PALABRAS CLAVE:

Identificación de especies; Degradación de ADN; PCR; Animales; Vegetales; GMOs.

ABSTRACT

The severe food crises suffered by European society caused by food-borne diseases, conditioned that all existing health and safety systems were questioned, with unprecedented repercussions in all sectors, demanding to the authorities guarantees about the quality, safety and veracity of the food labeling. As a result, in recent years there has been an increasing interest in determining the origin and composition of raw and processed food products, with special emphasis on animal and vegetable species declared or not; requiring the employ of sensitive, selective, fast, automated, economical and easy to use methods; to comply with Regulatory and protectionist objectives.

Identification and quantification of species in food is carried out by the detection of proteins and/or species-specific DNA sequences, presenting DNA certain advantages over protein-based methods. Among genetic methodologies, one of the most versatile options is focused on the application of final time polymerase chain reaction for DNA identification, and the real-time variant (qPCR) for determination and quantification of DNA present in complex samples. Among the different methodological variants of qPCR, highlights the systems based on the use of specific fluorescent probes. A variant of the usual fluorescence probes which higher affinity for the minor DNA groove (MGB) for polymorphism determinations in biomedical applications has been used for some years, which can be also applied in the identification and quantification of species in foods, allowing the amplification of highly fragmented DNA molecules in processed foods, and at the same time, to detect variations between phylogenetically closely related species and between varieties within the same species, by the analysis of single nucleotide polymorphisms.

Thus, suitable detectors have been developed in this thesis to differentiate mammals (beef, pork) and poultry (turkey, chicken) in fresh and processed samples, using as reference standard for normalizing concentrations, C_T values obtained for a 50:50 cow/pork or turkey/chicken mix, thus reducing the number of required standards. This approximation allows a realistic value of the difference in the number of copies of the target sequence per mass unit of the material used for each specie, to easily normalize the data obtained by qPCR to percentages of material of each species in the samples. These reference materials are suitable for

the analysis of processed foods, since they can be subjected to the same treatment as the samples to be tested.

In addition, the problem of discrimination of phylogenetically closely related species or varieties within the same species has been addressed, approaching the differentiation of orange and mandarin into juices. The developed method is based on the use of a set of primers, common to both species, and two TaqMan® MGB probes that differ in a single base, corresponding to the polymorphism that identifies each citrus specie. The obtained results evidenced that qPCR method allows a useful limit of detection for mandarin, differentiating between ingredient and contamination; although it is advisable the employ of sufficient control reactions with reference material, to avoid quantification errors due to the variability associated with the experimental measurements.

In addition, the validation of a PCR protocol was carried out in all food matrices covered in the *Codex Alimentarius* and feed, showing a LOD of 0.1% against certified reference material, for the identification of both P35S and TNOS sequences.

The overall results achieved in this thesis highlight the importance of the use of reference materials adapted to the matrix to be analyzed, for qualitative and quantitative applications, unlike other proposals that require the elaboration of a collection of reference samples with different percentages of the species to be detected in the mix, obtaining reliable data using a single reference sample with known content of the species to be analyzed (50% of each).

KEYWORDS:

Species identification; DNA degradation; PCR; Animals; Vegetables; GMOs.

I - INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

En la sociedad actual encontramos comportamientos incongruentes respecto a los alimentos destinados al consumo ya que parece que justo cuando la humanidad ha alcanzado su máximo nivel de seguridad e higiene alimentarias también lo haya hecho el de su temor a los alimentos, el de la sensación de que al alimentarnos incurrimos en riesgos considerables, riesgos que antes no existían y que han sido creados por las nuevas tecnologías. En este clima social, al explicar en qué consisten y como deben gestionarse los riesgos alimentarios, hay que abordar urgentemente la difícil tarea previa de deshacer algunos de los entuertos más notables, analizando en primer lugar la evolución de los hábitos alimentarios.

Los nuevos modelos de consumo se enmarcan en un sistema de preferencias cuyas raíces se asientan en el último tercio del siglo XX, en la época de la consolidación del consumo generalizado. Ese fenómeno, si bien fue algo más tardío en España debido a la autosuficiencia impuesta por el franquismo (1939-1959), que condujo a una etapa de hambruna y miseria; encontró fácil y rápido arraigo con el notable incremento de las rentas de los hogares y la apertura a las pautas culturales presentes en otros países del entorno. En este sentido, a las primeras fases de la evolución de la sociedad de consumo en España, caracterizadas por unos comportamientos adquisitivos menos críticos, ha sucedido otra de mayor reflexión que conlleva la exigencia hacia los productores y transformadores de alimentos (Consejo Económico y Social, 2017).

En efecto, el acceso generalizado a una amplia gama de bienes y servicios, incrementada por la globalización de mercados, trajo consigo un aumento equivalente de la percepción del riesgo por parte de los consumidores, que en consecuencia, han ido aumentando también sus exigencias de calidad y seguridad alimentaria, que se alcanza cuando todas las personas tienen acceso físico, social y económico permanente a alimentos seguros, nutritivos y en cantidad suficiente para satisfacer sus requerimientos nutricionales y preferencias alimentarias, y así poder llevar una vida activa y saludable (FAO, 1996).

Esas exigencias demandadas por los consumidores han tenido como respuesta institucional la elaboración de una legislación alimentaria tendente a garantizar la protección de forma estricta, que, con mayor o menor eficacia, ha contribuido a equilibrar la posición de los consumidores en el contexto del mercado global. Así, tanto la Declaración Universal de Derechos Humanos como la Constitución Española, recogen el derecho a la protección de la salud, y obligan a las autoridades competentes a garantizar la seguridad y salud de los consumidores.

Paralelamente, la consolidación del concepto de calidad de vida como elemento clave en el desarrollo social y económico de un país, ha ayudado a ampliar las “aspiraciones individuales” en las áreas de la salud, la seguridad económica, el acceso a la cultura y la educación, entre otras. Todos estos indicadores guardan una relación inequívoca con la capacidad de gasto y con el consumo, pues como ha sido ampliamente contrastado, la mejora de las posiciones socioeconómicas se relaciona con mejores valores paramétricos en los indicadores de calidad de vida. Por tanto, no es casual que un indicador básico como la salud se haya convertido en uno de los elementos motivadores de compra.

La relación entre la Nutrición y la Salud ha sido indisociable, y es frecuente la cita socrática “que tu alimento sea tu medicina”. Sin embargo, no ha sido hasta épocas recientes cuando la evolución de la sociedad ha conducido a la irrupción de un nuevo vector motivador de compra: el vector salud. Entre otros vectores motivadores menores, el placer, la conveniencia y la primera necesidad han sido tradicionalmente los componentes principales de la decisión de compra, pero actualmente existe un amplio sector de la población –a partir de 40 años-, que considera el factor salud como un criterio de peso en su alimentación.

Los niveles de desarrollo alcanzados por la ciencia y la tecnología en los albores del siglo XXI han revolucionado los sistemas de producción agroalimentaria, cuyos productos han enriquecido el mercado alimentario global, dando respuesta a las demandas de los consumidores, sin olvidar la gran sensibilidad desarrollada por la sociedad occidental en torno a la posible relación entre el consumo de alimentos y la salud de la población, constituyendo la seguridad alimentaria una de las principales contingencias de los consumidores, debido a la incidencia directa que los alimentos suelen tener sobre la salud.

En ese sentido, con frecuencia los reclamos publicitarios de los alimentos se basan en argumentos vinculados a su seguridad sanitaria, que hace referencia a la propiedad de no provocar ningún tipo de peligro o daño y, en consecuencia, de que el alimento está exento de riesgo.

En un sentido práctico, este concepto tiende a ser considerado en el ámbito alimentario como una propiedad inherente a los alimentos, que los faculta para que su consumo no produzca daño o enfermedad, porque carecen de aquellos agentes bióticos o abióticos, potencialmente nocivos para la salud (Bello-Gutiérrez, 2012).

1.1. EL RIESGO ALIMENTARIO Y SU PERCEPCIÓN

La evaluación de la calidad de los productos alimentarios es un factor de interés general y económico, puesto que afecta a su valor comercial en un mercado cada vez más permeable y con intereses más diversos. Pero para que la cadena alimentaria y el comercio funcionen correctamente, se requiere un denominador común, el factor de seguridad de los alimentos, que constituye el condicionante de la demanda económica de todos los mercados y la garantía de continuidad de los productos alimenticios en ellos.

Las fuertes crisis alimentarias vividas por la sociedad europea han provocado que los sistemas de producción, industriales, comerciales y de seguridad existentes, hayan sido puestos en duda y sometidos a presiones sin precedentes, con repercusiones en todos los operadores, sectores económicos, administrativos y políticos.

Es cierto que se producen accidentes alimentarios importantes, que adquieren gran notoriedad a través de los medios de comunicación, pero son solo excepciones a la regla general, al hecho de que nunca como hasta ahora, hemos tenido la capacidad de conocer los peligros y atajarlos. No debemos olvidar que nuestra esperanza de vida sigue creciendo, lo que se debe en parte a las mejoras conseguidas en seguridad alimentaria. Esto no quiere decir que no sigamos avanzando en el conocimiento sobre los aspectos adversos de nuestra alimentación, en especial sobre aquellos que se manifiestan a una edad tardía, y trabajando en perfeccionar el modo de evitarlos (García-Olmedo, 2009).

Es bien conocido que existe una gran discrepancia entre el riesgo objetivo y el percibido. Así, por ejemplo, el alcohol es uno de los primeros causantes de muerte en nuestra sociedad, mientras que no se ha podido imputar con fundamento una sola muerte a los conservantes. Sin embargo, el público subestima notablemente la importancia del primer factor de riesgo y sobrestima con desmesura la del segundo.

La carencia y el exceso alimentario, junto con la dieta sesgada, constituyen las grandes contingencias actuales en seguridad alimentaria y por desgracia, estos problemas tienen un origen complejo y una solución difícil. Los demás riesgos palidecen ante estos.

1.2. EFECTOS ADVERSOS DE ORIGEN ALIMENTARIO

Desde el punto de vista sanitario, la seguridad absoluta es inalcanzable en alimentación, no se puede suprimir el riesgo inherente a cualquier alimento, sustancia o comportamiento humano. Asumido esto, se impone la aplicación del concepto riesgo-beneficio a los alimentos, ya sean naturales o antropogénicos. La aplicación de estos conceptos corresponde a la toxicología alimentaria, para la que todo es veneno. Solo la dosis ingerida puede hacer que no lo sea. Así, cualquier alimento y cualquier bebida que se tome en cantidad superior a esa dosis es un veneno. Por sí sola esta observación merece todo crédito, pero quizá lo más llamativo sea que su autor, un alquimista llamado Paracelso, la escribió en 1564.

Los alimentos constituyen la vía principal de entrada de nutrientes, contaminantes bióticos y/o abióticos, así como de sustancias incorporadas fraudulentamente o no, en cantidades superiores a los límites establecidos, que pueden desencadenar graves repercusiones en la salud de los consumidores si no se siguen las buenas prácticas de fabricación y la normativa alimentaria vigente.

Así, los posibles efectos adversos de origen alimentario, reales o imaginados, pueden deberse a agentes biológicos patógenos como bacterias, hongos, virus, priones, protozoos y helmintos, presentes con distinta frecuencia en los alimentos, que representan un peligro para la salud que es mucho mayor que el de los tóxicos químicos, incluidos componentes naturales, aditivos y contaminantes.

Entre los compuestos abióticos cabe destacar los aditivos autorizados o no; contaminantes ambientales, entre ellos los productos fitosanitarios, sustancias con actividad farmacológica administradas al ganado, metales pesados o sustancias incorporadas a los recubrimientos de envases metálicos que pueden migrar al líquido de gobierno; la generación de compuestos tóxicos durante el procesado de los alimentos; los alimentos obtenidos o manipulados por ingeniería genética y los alimentos funcionales, que han irrumpido con fuerza en el mercado alimentario, que son claros exponentes de los posibles riesgos alimentarios a los que nos podemos enfrentar con relativa frecuencia.

La toxicología estudia las respuestas de los sistemas biológicos a los agentes tóxicos mediante experimentación con animales y observaciones sobre el propio organismo humano. Está sujeta al método científico respecto a la generación, reproducibilidad e interpretación de los datos, y sirve de base objetiva a normativas en las que concurren, elementos sociopolíticos y consideraciones sobre la relación riesgo/beneficio.

El desarrollo normativo reviste la dificultad que supone extrapolar y traducir en recomendaciones para humanos datos científicos obtenidos principalmente en sistemas animales, junto con la de tener que deducir posibles efectos a bajas dosis a partir de experimentos con altas dosis.

Los daños causados por una sustancia química pueden ser inmediatos, tras el consumo de una sola dosis, o manifestarse a largo plazo, en respuesta a una exposición repetida e incluso, continua. En la determinación de la dosis diaria admisible (DDA) para humanos de cada sustancia, se toma como referencia la dosis máxima sin efecto (mg/kg) en la especie animal más sensible entre las ensayadas (la que la tenga más baja), y se le aplica un factor de seguridad de 100 (DDA debe ser cien veces menor) o, en caso de duda, de 1000 (Reagan-Shaw y col., 2008). Se considera empíricamente que la dosis así calculada para cada sustancia, puede ser consumida por los humanos durante toda la vida sin efecto adverso alguno.

1.3. SUSTANCIAS QUE AMENAZAN LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

Los compuestos capaces de inducir cáncer, los carcinógenos, fueron descritos hace más de 30 años como sutiles, furtivos, siniestros saboteadores de la

vida en el curso de su severa proscripción legislativa. Tanto los carcinógenos como los teratógenos, sustancias que promueven malformaciones en el desarrollo fetal, y los mutágenos, inductores de mutaciones en el ADN, podrían ser considerados como taimados fantasmas, dado lo elusivo de sus efectos, si no fuera porque las metáforas son peligrosas en ciencia.

En efecto, la legislación antes aludida, la cláusula Delaney (Merrill, 1988), de la enmienda a la ley de aditivos alimentarios de Estados Unidos (1958), obedeció más a la emoción coyuntural que a los (escasos) conocimientos disponibles entonces, y ha tenido que ser revocada tres décadas más tarde ante las dificultades insalvables para su aplicación.

La cláusula Delaney prohibía el uso de un aditivo independientemente de la dosis efectiva, previendo así que indujera cáncer en la especie humana o en cualquier otra especie animal. En otras palabras, no se consideraba de aplicación para estos casos el concepto de dosis máxima sin efecto. Los métodos de ensayo disponibles en 1958 sólo permitían detectar carcinógenos potentes y habría que esperar una década hasta descubrir que estos carcinógenos, o sus productos de transformación, reaccionaban con el ADN y eran mutagénicos (genotóxicos) en distintas especies.

Fue precisamente Bruce Ames, uno de los científicos más citados del siglo XX, quien desarrolló unos ensayos de mutagenicidad en bacterias que eran a la vez rápidos, fáciles y muy sensibles (Ames, 1992). Más tarde se evidenció que mientras el 80% de los mutágenos eran cancerígenos en ratones, una fracción notable de estos últimos no eran mutagénicos. Además, los cancerígenos que son mutagénicos (genotóxicos) son activos en varios tejidos y en varias especies, en tanto que los no genotóxicos suelen afectar a tejidos y especies concretas, requiriendo dosis altas para ejercer su acción, que es esencialmente fisiológica y no genética. Un ejemplo de estos últimos es el limoneno, componente del zumo de limón y de otros cítricos, que induce tumores renales sólo en ratas macho, y es inocuo para humanos.

Cuando la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) trató de racionalizar la aplicación de la ley por vía de excepciones para sustancias no genotóxicas que fueran cancerígenas en ratones, pero no en humanos, así como de aplicar criterios de riesgo/beneficio a carcinógenos genotóxicos, con autorizaciones de *minimis* que suponían menos de 1 cáncer por

millón de personas en 70 años, los tribunales indicaron que era necesario cambiar la ley para que fueran aceptables, y así se hizo ya que obviamente el aceite de maíz y el zumo de limón no debían ponerse en el mismo saco que la dioxina.

Diariamente, la inocuidad de los alimentos puede quedar en evidencia por la presencia de diferentes agentes intrínsecos o ajenos al mismo, añadidos con o sin intención, o aparecer en el alimento tras someterlo a ciertos tratamientos durante el procesado industrial, y que representan un riesgo potencial para la salud (RASFF, 2015). Este riesgo y su gravedad dependerán entre otros factores, de la naturaleza del contaminante (su toxicidad) y del grado de exposición al mismo (concentración, tiempo, etc.). Estos agentes se clasifican habitualmente en diferentes grupos según su naturaleza.

1.3.1. Componentes intrínsecos

Según cuenta en *Anabasis*, Jenofonte volvía de Babilonia al mando de diez mil griegos cuando hicieron alto a orillas del Mar Negro, donde abundaba una miel silvestre que les deleitó primero, para luego enajenarlos y postrarlos durante varios días (González, 2012). Habían probado los efectos de las andrómedotoxinas de los rododendros y las azaleas, concentradas por las abejas. No cuenta Jenofonte si sus soldados desearon repetir el extraño viaje, pero quién no pudo repetir el suyo fue la madre de Abraham Lincoln, pues murió cuando éste tenía nueve años, al ingerir leche de unas vacas que habían comido plantas de bistorta (*polygonum*).

Como se ha descrito anteriormente, son sustancias que se encuentran de manera natural en los alimentos, es decir, no son añadidas ni se generan tras someterlos a procesos de transformación industrial; ni aparecen a consecuencia de contaminaciones cruzadas, y que en función de la dosis ingerida o bien la susceptibilidad del consumidor, pueden provocar efectos adversos y morbilidad, como ocurre con los alérgenos alimentarios (shock anafiláctico).

Sin embargo, el mito de lo natural triunfa en la sociedad moderna hasta extremos verdaderamente ridículos (hay incluso tiendas que venden muebles naturales). Natural no es sinónimo de inocuo, ni artificial lo es de peligroso.

De hecho, ningún alimento de los que consumimos actualmente es natural. Éstos proceden de especies domesticadas de plantas y animales que son

prácticamente incapaces de vivir en vida libre, de sobrevivir en la naturaleza. Hay que añadir que es afortunado que no sean naturales, ya que en el proceso de profunda alteración genética que supuso la domesticación, se les eliminaron algunas de las sustancias tóxicas más notables.

A pesar de todo, la lista de sustancias adversas que son componentes naturales de nuestros alimentos es interminable. Sin embargo, dichos componentes representan un peligro para la salud humana que es desdeñable en la práctica si la dieta es variada, aunque es muy superior al de las sustancias artificiales añadidas legalmente a los alimentos.

Es cierto que las bebidas alcohólicas, el café, las setas comestibles, las patatas, las peras, el perejil y las especias, entre otros elementos cotidianos de nuestra dieta, contienen sustancias que a ciertas dosis producen cáncer en ratones. Sin embargo, según cálculos fiables, el grado de exposición de los humanos a dichas sustancias no representa un peligro significativo. Además, nuestros alimentos, especialmente las frutas y verduras, también contienen numerosas compuestos antioxidantes y anticancerígenos que ejercen un efecto protector. De hecho, se considera el consumo de frutas y verduras como el mayor factor dietético de protección frente al cáncer (Olmedo, 2004).

1.3.2. Microorganismos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), son un problema de salud pública en todo el mundo y una causa importante de morbilidad, suponiendo un gasto sanitario significativo, perjuicios para los consumidores y una traba al comercio internacional de productos alimenticios.

Hasta la fecha se han descrito más de 250 enfermedades que se transmiten a través de alimentos y su incidencia ha aumentado considerablemente durante las últimas décadas por la rápida globalización del mercado de alimentos y los profundos cambios en los hábitos de consumo. Además, este problema se acrecienta con el desarrollo de nuevas formas de transmisión, la aparición de grupos poblacionales vulnerables (enfermos crónicos y personas de edad adulta), y el aumento de la resistencia de los microorganismos patógenos a los compuestos antimicrobianos.

Se sabe que alrededor de 40 patógenos diferentes de origen alimentario causan enfermedades en el hombre (Marder, 2017). Más del 90% de los casos confirmados y las muertes causadas por dichos patógenos han sido atribuidos a bacterias. Entre las bacterias más comunes se encuentran: *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus* y *Campylobacter jejuni*. No obstante, aproximadamente el 98% de los microorganismos encontrados en los productos alimenticios no son patógenos. Por esta razón, se requiere desarrollar pruebas de diagnóstico que puedan detectar específicamente y de forma rápida, el microorganismo de interés.

La mayoría de los patógenos asociados a toxiinfecciones alimentarias son zoonóticos (de origen animal), y sus portadores son habitualmente animales sanos desde los cuales se transmiten a una gran variedad de alimentos, como ocurre con *Salmonella spp.*, y *Escherichia coli*. Otros patógenos como *Listeria monocytogenes* se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente o forman parte de la microbiota habitual del hombre. En estos casos, la contaminación de los alimentos se produce durante su procesado, como resultado de defectos en las prácticas higiénicas.

Los animales de granja habitualmente se contaminan debido a la transmisión horizontal desde el ambiente en el que se encuentran, a través de otros animales contaminados, el agua o animales salvajes como pájaros o roedores. Esta transmisión horizontal se ve favorecida por las condiciones de hacinamiento a las que se ven sometidos los animales en muchas granjas. Tras su paso por la cadena de producción, los productos derivados de estos animales llegan al consumidor.

Habitualmente, las toxiinfecciones alimentarias se asocian a alimentos de origen animal o derivados como productos cárnicos, huevos, productos lácteos, etc. Sin embargo, la creciente demanda de productos más saludables por parte del consumidor, ha llevado en los últimos años, al aumento en el consumo de ensaladas preparadas, frutas y verduras.

A pesar de que el número de brotes asociados a estos productos es menor que los relacionados con alimentos de origen animal, en los últimos años han aumentado de forma considerable. Este aumento se debe principalmente a las nuevas prácticas agrícolas que permiten disponer de todo tipo de productos

vegetales a lo largo del año, y al riego masivo con aguas reutilizadas o procedentes de depuradoras que, en ocasiones, presentan niveles de contaminación fecal por encima de lo permitido, causando la contaminación de los cultivos.

Todos estos productos se consumen habitualmente crudos y con poco o ningún procesado previo, y muchos de ellos llegan al mercado lavados, cortados y listos para ser ingeridos, pudiendo provocar infecciones e intoxicaciones en el consumidor. Durante el cultivo, la recogida, el transporte y el procesado posterior, pueden contaminarse con patógenos de origen tanto animal como humano. Así, la contaminación de ensaladas, frutas y verduras durante su producción y procesado (incluyendo malas praxis en la desinfección del agua de lavado), puede provocar la aparición de grandes brotes, extendiéndose a lo largo de amplias áreas geográficas. Además, se prevé que estos brotes sean cada vez más comunes debido al aumento en la distribución global de los alimentos.

Muchos de los agentes patógenos producen toxinas que son responsables de los efectos patológicos, mientras que otros son meramente infecciosos. La producción de toxina por unos patógenos ocurre en el alimento y en otros, en el intestino. Los primeros pueden causar trastornos incluso después de haber sido eliminados, si la toxina que producen es termo-resistente y persiste en el alimento. Así, las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum* producen sendas toxinas en el alimento, pero la primera es resistente al calor y la segunda es termosensible. Según el patógeno que se considere, el tiempo de incubación puede variar entre 1 hora y varias semanas e incluso años, como en el caso de los priones que causan la enfermedad vulgarmente conocida como de las vacas locas.

Las intoxicaciones bacterianas suelen producir gastroenteritis aguda y, en ocasiones, dar lugar a muerte por deshidratación, especialmente en los niños desnutridos. Algunas toxinas, tales como la botulínica, afectan al sistema nervioso y son letales. También son letales los efectos neurotóxicos de los priones, cuya propagación afortunadamente, se controló pronto mediante la abolición de la práctica industrial que la originó (Zúñiga-Quiñónez y col., 2002).

Las infecciones por bacterias o por virus, como la tuberculosis o la brucelosis, muestran síntomas específicos encada caso. Entre las toxinas fúngicas, las aflatoxinas merecen especial mención porque pueden estar presentes en

granos y frutos secos y son causantes de enteritis y de hepatitis, incluso cuando se consume carne de un animal alimentado con el pienso vegetal contaminado. En ocasiones, bien por la escasez de alimentos o por el desconocimiento de las posibles consecuencias (graves repercusiones para la salud), se originan por el consumo de productos altamente enmohecidos. Estos hábitos alimentarios se siguen practicando en muchas regiones del mundo, por lo que las autoridades sanitarias realizan muestreos periódicos a fin de evaluar la incidencia de la salud humana y animal. Desafortunadamente, este problema no está limitado a la micotoxicosis agudas originadas por el consumo de productos agroalimentarios altamente enmohecidos, las investigaciones realizadas en los últimos años han puesto de manifiesto que el problema puede ser más importante de lo esperado.

El término micotoxina hace referencia a productos naturales de origen fúngico que provocan una respuesta tóxica cuando son administradas en bajas concentraciones a grandes vertebrados. Atendiendo a la definición de Pitt y Hocking (1997), las micotoxinas son metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales (sin excluir las aves) y personas”.

La mayoría de las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas y presentan una gran diversidad de estructuras químicas. Hasta la fecha se conocen entre 350 a 400 metabolitos de hongos con características toxigénicas (Betina, 1989). Las aflatoxinas han sido una de las primeras micotoxinas descritas y mejor definidas en cuanto a sus características estructurales; mientras que las fumonisinas son las de más reciente estudio (Marasas y col., 1988).

En la actualidad, aflatoxinas, ocratoxina A, deoxinivalenol (nivalenol, en algunas zonas), zearalenona y fumonisinas son las micotoxinas de mayor importancia en los productos agrícolas. Esta aseveración se basa en un extenso estudio analítico (IARC, 1993) que contiene una información muy detallada de la distribución de los hongos en los principales cultivos. Esta lista, aunque aparentemente corta, implica una extensa gama de problemas científicos de abordaje complejo, relacionados con la identificación inequívoca de las especies fúngicas productoras, matrices alimentarias o análisis de las toxinas implicadas. La globalización de los mercados, incluido el de productos alimenticios y sus derivados, origina que las posibles contaminaciones, de cualquier etiología,

repercutan a nivel internacional y no queden restringidas únicamente al país productor (Miller, 1995).

Debido a su potencial toxicidad, los niveles de micotoxinas en alimentos deben ser controlados mediante programas de prevención que incluyan legislación de concentraciones máximas aceptadas (Moss, 1996; Comisión Europea 2006a) y recomendaciones acerca de la producción y manipulación de las materias primas que se utilizan para la obtención de distintos alimentos (Le Bars 1998; Comisión Europea, 2006b).

1.3.3. Contaminantes abióticos

Diferentes productos químicos aparecen en nuestros alimentos de modo habitual debido a la contaminación ambiental y a los propios procesos de su producción y transformación industrial. Además, aparecen con cierta frecuencia productos usados de forma desmedida, fraudulenta o ilegalen alguna fase de la producción. Todos estos contaminantes son susceptibles de un control estricto para asegurar su ausencia o para que los niveles a que están presentes no sean perjudiciales para la salud. Dicho objetivo exige no sólo una normativa adecuada sino un férreo seguimiento analítico institucional.

Los contaminantes ambientales más frecuentes son compuestos orgánicos, como bifenilos policlorados (PCBs) o dioxinas, isótopos radiactivos y metales pesados, entre los que se encuentran el cadmio, el plomo, el aluminio y el mercurio (Yılmaz y col., 2017). Este último, por ejemplo, aparece de modo natural en las aguas dulces y salinas. Además, su concentración en ellas se ve aumentada como consecuencia de la actividad humana (combustión de carbones, incineración de basuras, emisiones industriales).

El metal es transformado por los organismos acuáticos en metil-mercurio, un derivado orgánico muy tóxico, el cual es concentrado a través de la cadena alimentaria. Como consecuencia, los pescados y mariscos contienen este producto en cantidades que varían según la especie y la procedencia. Si se consume pescado y marisco con mucha frecuencia, se deben diversificar las especies utilizadas para no exceder la dosis diaria admisible establecida para el metil-mercurio por la Organización Mundial de la Salud (0,47 µg/kg).

También deberán darse gracias a la providencia por permitirnos tal lujo. De todos modos, los beneficios para la salud que se derivan de consumir pescado, superan ampliamente a los riesgos.

Hay que tener en cuenta que tanto la producción vegetal y animal, junto al procesamiento industrial y el envasado de los alimentos están altamente tecnificados en la actualidad y conllevan el uso de productos fitosanitarios, fertilizantes, fármacos, antibióticos y hormonas, que en unos casos están justificados y en otros son claramente ilegales (Cimino y col., 2017; Ronquillo y col., 2017). La prensa diaria da cuenta con relativa frecuencia del empleo de clenbuterol en el engorde del ganado, que, además de ilegal y fraudulento, supone riesgos indudables para la salud. Por otra parte, el uso de andrógenos en la producción animal es objeto de agrio debate entre Estados Unidos y la Unión Europea, y también es muy controvertido el uso de antibióticos por la industria de piensos. Como ya se ha dicho, el desarrollo de una buena normativa de uso es imperativo, como lo es su estricto cumplimiento y control analítico, para que en ningún caso se supere la DDA de cada uno de los contaminantes.

1.3.4. Nuevos terrores, los organismos modificados genéticamente

El hombre lleva miles de años modificando los vegetales que utiliza como alimento. Podríamos decir que todos los vegetales que actualmente se cultivan están modificados genéticamente, ya que, de alguna manera han sido modificados respecto a sus ancestros salvajes a través de sucesivos cruzamientos controlados y selección posterior. Los métodos clásicos de mejora genética han permitido obtener nuevas especies, variedades o híbridos, con mejores rendimientos productivos o mejores cualidades que sus líneas ancestrales. Por ejemplo, las coles de Bruselas, la coliflor y el brócoli, son variedades obtenidas artificialmente a partir de la misma especie (*Brassica oleracea*). También se han obtenido por mejora genética, las variedades de manzana, maíz, trigo, etc., que conocemos y consumimos en la actualidad (Díaz y Chaparro-Giraldo, 2012).

Las actividades de mejora genética a través de cruzamientos controlados y selección no se han restringido exclusivamente a la obtención de variedades de una especie, también se han realizado entre especies. Por ejemplo, está el triticale,

híbrido obtenido a partir del trigo y el centeno, que es un cereal muy importante en la alimentación (Gustafson, 1976).

Estas actividades, que se han ido realizando desde que el hombre ha cultivado los vegetales, conllevan un intercambio de genes a lo largo del tiempo entre variedades o especies estrechamente relacionadas.

Sin embargo, la obtención de nuevas variedades o especies a través de la hibridación tradicional y selección, presenta una serie de desventajas. Una de las principales desventajas es que este proceso no puede realizarse de una forma controlada en el sentido de que, generalmente, solo se desea transferir una característica concreta de una especie a otra, no transferir el genoma completo o producir recombinación entre ellos. Por otra parte, la selección de las variedades genéticamente estables con las características deseadas es un proceso lento.

Estas desventajas han sido superadas a través de la aplicación de la ingeniería genética, que engloba un conjunto de técnicas que permiten alterar las características de un organismo mediante la modificación dirigida y controlada de su genoma (Daniell y col., 2005). Las modernas técnicas de manipulación genética permiten llevar a cabo, en pocos años, lo que podría durar décadas con las técnicas de mejora genética clásica. Por otra parte, con las técnicas de ingeniería genética, se puede conseguir que un organismo desarrolle características imposibles de transmitir con las técnicas tradicionales de cruzamiento y selección.

Un organismo modificado genéticamente es aquel en el que mediante técnicas específicas de manipulación genética, se ha producido una modificación de su carga genética natural (genoma) y reciben el nombre de Organismos Modificados Genéticamente (OMG). Se trata de modificaciones inducidas, diferentes a las que se producen de forma natural en el apareamiento, recombinación, o cualquier otro proceso biológico de transferencia de material genético (Corti, 2010). La modificación puede consistir en una modificación de la expresión de sus genes, delección o pérdidas parciales de los mismos, o la incorporación de material genético procedente de otras especies o variedades. En este último caso (organismos que han incorporado genes o material genético extraño), los organismos resultantes reciben el nombre de transgénicos.

Aplicado a los cultivos vegetales, el término OMG hace referencia a plantas cuyo genoma ha sido modificado de manera estable mediante técnicas de ingeniería genética para introducir un gen o un grupo de genes. Como

consecuencia de la introducción de estos genes, la planta modificada genéticamente muestra una nueva característica. Esta nueva característica puede estar codificada en los genes introducidos o puede ser el resultado de una modificación de la función de un gen propio de la planta, debida a la introducción del material genético exógeno.

La producción de una planta transgénica consta de dos etapas principales denominadas transformación y regeneración. La transformación genética es el proceso mediante el cual se introduce un gen o un conjunto de genes en el genoma de una célula vegetal. La regeneración consiste en la obtención de la planta completa a partir de la célula transformada. Aunque hay varios métodos para llevar a cabo la transformación genética de células vegetales, hay dos que son los que se han utilizado con mayor frecuencia.

La tecnología inicial desarrollada en los años 80 para transformar células vegetales utiliza una bacteria, *Agrobacterium tumefaciens*, que transfiere genes a las células vegetales de forma natural (Díaz y Chaparro, 2012). *Agrobacterium tumefaciens* es un microorganismo patógeno del suelo que infecta a las plantas dicotiledóneas. Esta bacteria tiene una habilidad excepcional para transferir un fragmento concreto de ADN (T-DNA) desde su plásmido Ti (plásmido inductor de tumores), al núcleo de las células infectadas, integrándose de manera estable en el genoma de estas células. El plásmido Ti se utiliza en ingeniería genética como vector de transformación.

Para transformar las células vegetales, parte del ADN del plásmido Ti se sustituye por el gen que se quiere transferir a la célula vegetal y que puede proceder de cualquier organismo. Al infectar a las células, *Agrobacterium* transfiere el gen que se encuentra en su plásmido Ti al genoma de la célula vegetal (**Figura I.1**).

El gen que se quiere transferir a la planta, se aísla del genoma del organismo que lo contiene. Este gen es incorporado al plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias que contienen el plásmido de interés se ponen en contacto con el tejido vegetal que se quiere transformar. Algunas de las células vegetales incorporan a su genoma el gen, transferido desde el plásmido Ti. Posteriormente se regenera la planta, a partir de estas células transformadas, que contendrá en su genoma el gen de interés.

La utilización de *Agrobacterium* como “ingeniero genético natural” revolucionó el desarrollo de los vegetales modificados genéticamente.

Sin embargo, *Agrobacterium* únicamente infecta a las dicotiledóneas, de forma que muchas plantas de gran interés económico (como los cereales), permanecieron inaccesibles a las técnicas de ingeniería genética durante mucho tiempo.

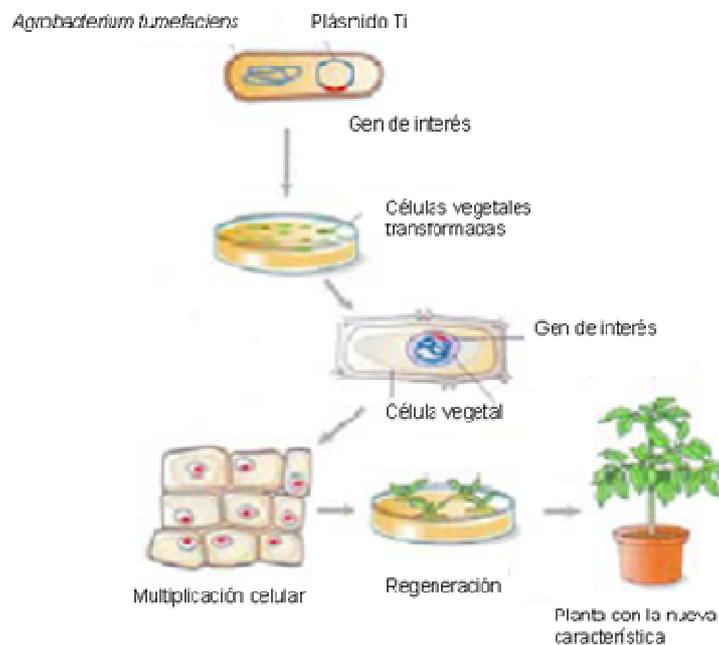


Figura I.1: Mecanismo de transformación en vegetales con *Agrobacterium*.

Las plantas monocotiledóneas han sido transformadas utilizando una técnica llamada biolística.

El ADN que se quiere introducir en la célula vegetal se absorbe a unas micropartículas esféricas de oro o tungsteno que son proyectadas contra el tejido de la planta a alta velocidad. Algunas de las células son capaces de integrar en su genoma el ADN absorbido en estas esferas, produciéndose de esta manera la transformación de las células vegetales (**Figura I.2**).

Los fragmentos de ADN que contienen el gen de interés son absorbidos a las micropartículas. Las partículas portadoras del ADN son aceleradas a alta

velocidad en dirección a las células diana. Los fragmentos de ADN son liberados y se integran en el genoma de algunas células. Por último, la planta transgénica es regenerada tras la selección de las células transformadas.

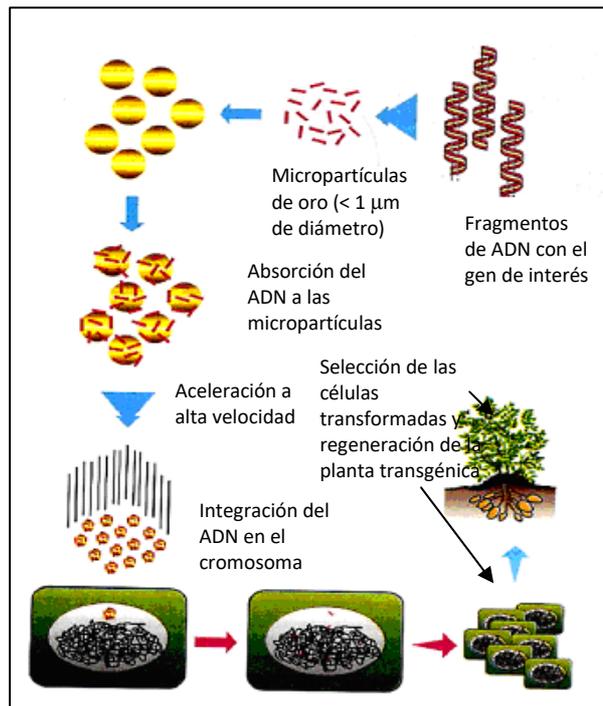


Figura I.2: Transformación genética de plantas a través del bombardeo con microproyectiles.

Sea cual sea el método utilizado, las células vegetales que son transformadas se regeneran en la planta, que incorpora el nuevo gen o genes de interés en su genoma. Esta regeneración se realiza *in vitro* mediante el cultivo de tejidos en medios controlados y apropiados para esta regeneración. Para que se regeneren exclusivamente las células transformadas, generalmente se introducen junto con el gen de interés, genes que confieren a las células que los integran alguna característica selectiva (como resistencia a un antibiótico).

El primer alimento transgénico aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA, USA), se comercializó en Estados Unidos en 1994. Se trataba de un tomate FlavrSavr™ (MacGregor), al cual se le introdujo una copia invertida (antisentido), suplementaria de un gen que codifica la enzima poligalacturonasa,

capaz de atacar las pectinas componentes de la pared celular vegetal, consiguiendo retrasar la maduración un 90% (Degnan, 2007). Desde entonces hasta nuestros días, se han comercializado más de 90 alimentos OMG en el mundo, sobre todo en Australia, Canadá y Estados Unidos., y la producción de cultivos transgénicos ha tenido un aumento exponencial, aunque se estima que se reducirá notablemente debido, en gran parte, a la desconfianza que ha surgido en algunos sectores sobre su impacto en el medio ambiente y sus potenciales riesgos para la salud.

El crecimiento de los cultivos transgénicos se ha debido tanto al aumento en el número de vegetales modificados genéticamente con características nuevas que se han producido, como al incremento del número de países que los han incorporado a su agricultura (Anklam y col., 2002). Por este motivo, en la actualidad es extraño no encontrar en el mercado y consumir un organismo genéticamente modificado teniendo consciencia de ello o no (Devos y col., 2017).

Desde el año 1994, la organización ISAAA (instituto especializado en el seguimiento del uso de los OMG), viene recabando información sobre la producción mundial de cultivos modificados genéticamente, que en el año 2014 aumento un 12% respecto al 2013 (**Figura I.3**), revelando además que el 5% de los 1,5 millones de hectáreas de toda la superficie cultivable mundial estuvo ocupado por cultivos OMGs (James, 2014).

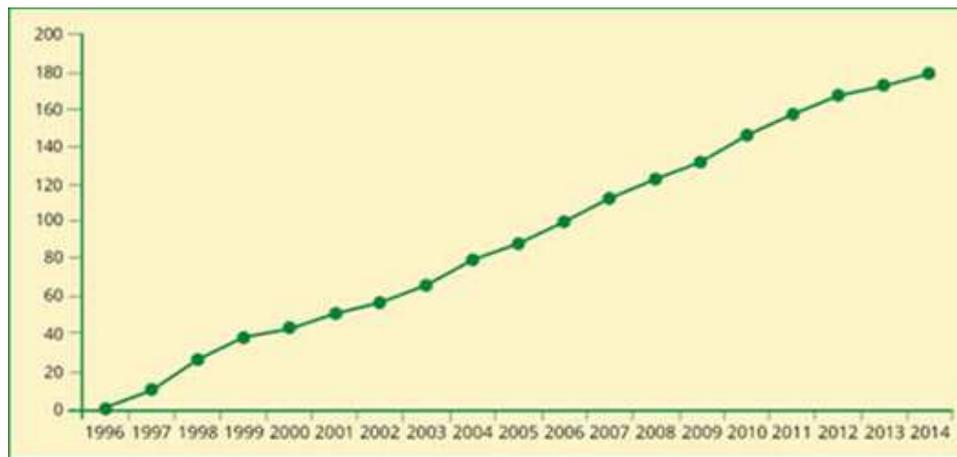


Figura I.3: Área global de cultivos biotecnológicos desde 1996 hasta 2014 (millones de hectáreas).

El mayor porcentaje de OMG comercializados corresponde a vegetales y se han construido plantas resistentes al ataque por plagas (viroides, virus, bacterias, hongos o insectos). Con ellas se busca tener semillas de variedades de gran interés agronómico, ya que no es necesario el empleo de productos fitosanitarios al ser la propia planta resistente al ataque de plagas gracias al nuevo gen introducido. Así, se logra un efecto doble, por un lado, se abarata el coste de producción al no utilizar plaguicidas, pudiendo soportar el incremento del precio de la semilla y por otro, se reduce el impacto ambiental (Estruch y col., 1997).

Otro gran grupo de vegetales transgénicos es el representado por la soja que contiene en su genoma un gen proveniente de la petunia, que confiere resistencia al herbicida glifosato (Shah y col., 1986). De esta forma, es posible tratar la plantación transgénica con el herbicida y eliminar sólo las malas hierbas. Los incrementos de producción por el empleo de este cultivo OMG se sitúan en torno al 20%, por lo que el uso de semillas de soja transgénica alcanzó en 2014 el 82% (90,7 millones de hectáreas), de los 111 millones de hectáreas de la soja plantada a nivel mundial (**Figura I.4**).

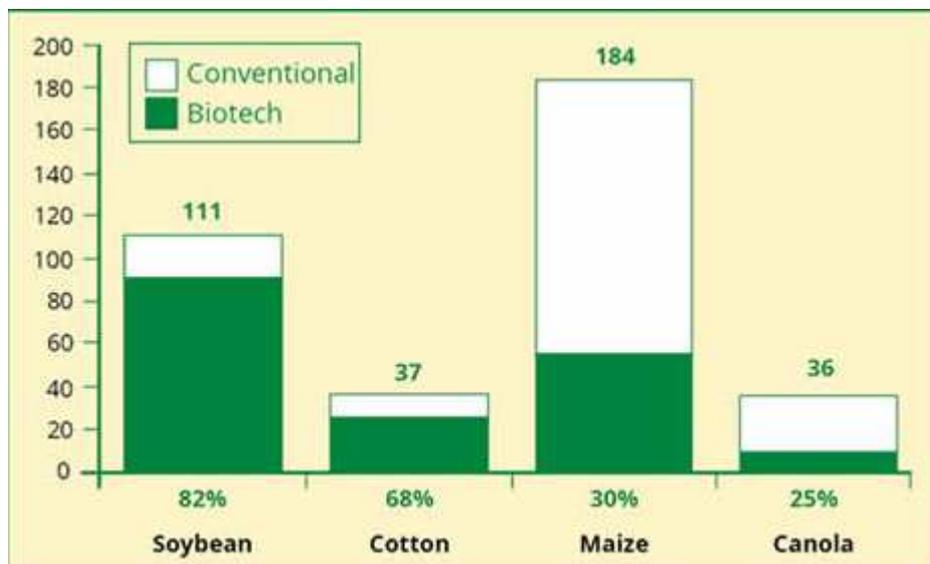


Figura I.4: Tasas de adopción mundial de los principales cultivos biotecnológicos (millones de hectáreas). Fuente: James C, 2014.

El algodón modificado genéticamente se plantó en 25,1 millones de hectáreas, representando el 68% de los 37 millones de hectáreas de algodón mundial. De los 184 millones de hectáreas de maíz mundial plantadas en 2014, 55,2 millones de hectáreas (30%), correspondieron a maíz modificado genéticamente. Respecto a la canola modificada genéticamente, fue plantada en 9 millones de hectáreas, lo que supone el 25% de los 36 millones de hectáreas de canola cultivadas a nivel mundial (James, 2014).

En la Unión Europea en el año 2014, tan solo cinco países cultivaron la misma cantidad de OMGs que el año anterior, sembrando 143.016 hectáreas de maíz Bt. Se registraron aumentos modestos en tres países: Portugal, Rumania y Eslovaquia, así como descensos marginales en dos países: España y República Checa. España lideró la Unión Europea con 131.538 hectáreas de maíz Bt (**Figura I.5**), registrándose una bajada del 3% respecto de las 136.962 en 2013, pero con un récord de 31,6% de adopción (Persall, 2016).

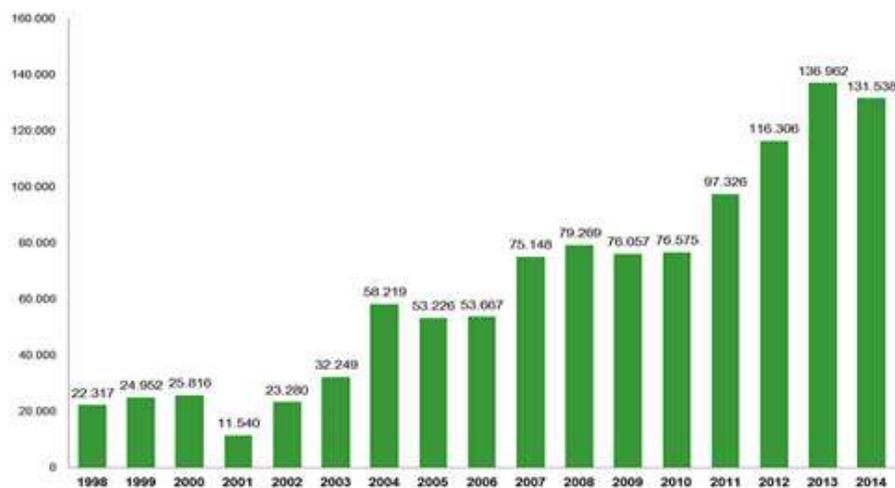


Figura I.5: Evolución de las hectáreas de maíz Bt cultivadas en España. Fuente: Fundación Antama, 2014.

A pesar de los años con lo que estamos conviviendo con este tipo de alimentos aun hoy son objeto de debate, sobre todo en la UE donde se cuestiona su utilidad y sus riesgos asociados a su comercialización y no existe un consenso

de si estas tecnologías son seguras, esto junto a la importancia de un correcto etiquetado para evitar el fraude, hace inminente la necesidad de desarrollar técnicas moleculares que permita detectar estos organismos en los alimentos

Actualmente, la presencia de los vegetales modificados genéticamente en los alimentos se limita, casi exclusivamente a la soja y al maíz. La soja y el maíz (y sus derivados) forman parte de más del 60% de los alimentos transformados que consumimos.

La utilización fundamental del maíz en la alimentación se centra en la obtención de almidón, y a partir de éste, glucosa y fructosa, aunque también se utiliza la harina en la producción de determinados alimentos.

En el caso de la soja, su utilización en la alimentación como tal es anecdótica. La soja es transformada para la obtención de aceite, lecitina (E-322), proteína y grasas (en muchos productos alimenticios reciben el nombre de proteína/grasa vegetal). Podemos encontrarnos aceite, lecitina y proteína de soja, así como almidón de maíz, en una gran variedad de alimentos: alimentos infantiles, embutidos, margarinas, sopas, salsas, galletas, chocolate, aperitivos, bebidas, conservas, congelados, y un largo etc. Pero como consumidores podemos elegir adquirirlos o no, ya que están sujetos a una regulación sin precedentes en el mercado alimentario, aunque con frecuencia se detectan fraudes al no etiquetar correctamente o bien, al utilizar eventos no autorizados en la UE (Broeders y col., 2014).

El etiquetado correcto de los productos destinados al consumo no sólo es un derecho de los consumidores, sino también una herramienta para controlar e informar sobre cualquier riesgo al consumirlo (Sebastián-Ponce y col., 2014).

El cultivo de una variedad modificada genéticamente en nuestro país, requiere como primer paso la aprobación por parte de los Estados Miembros de la UE de la modificación genética. Esta autorización se realiza siguiendo las directrices expuestas en la Directiva 2001/18/EC (EU, 2001), sobre la liberación en el medio ambiente de OMG y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE (EU, 1990). La Directiva 2001/18 establece el procedimiento a seguir para autorizar la liberación de los OMG en el medio ambiente, tanto con fines experimentales como para su comercialización. En ella se describe el formato de solicitud para la autorización y toda la información que debe acompañar a esta solicitud: datos sobre la modificación genética, datos de los estudios realizados sobre el posible

impacto ambiental y riesgos para la salud, una evaluación sobre los exámenes realizados en campos experimentales, etc. Esta información es examinada por el Comité Científico correspondiente que emitirá el dictamen sobre la modificación, pudiendo ser favorable o no.

El procedimiento para la autorización de una nueva variedad modificada genéticamente destinada al consumo humano, sigue prácticamente el mismo esquema que el requerido para la liberación en el medio ambiente, aunque con algunas diferencias. En este caso, las solicitudes para la autorización son remitidas al SCF (Comité Científico para Alimentos), que emitirá un dictamen, favorable o no, sobre la solicitud. Los requisitos y los procedimientos para la autorización de los alimentos modificados genéticamente quedan recogidos en el Reglamento (CE) 258/979 (EU, 1997), sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios, entre los que se incluyen los OMG.

Siguiendo los procedimientos de estas Directivas, hasta el momento han sido autorizados 58 OMG en la UE para usos alimentarios y piensos que contienen uno o varios eventos: maíz, algodón, soja, colza y remolacha azucarera. Están pendientes de resolución 46 expedientes, y 17 de ellos tienen una opinión favorable de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), y 1 opinión concluyente (EU, 2015).

Este reglamento fue la primera normativa que apareció para regular el etiquetado de los alimentos transgénicos. Según este reglamento, todo alimento que contenga o se haya fabricado a partir de organismos modificados genéticamente debe ir etiquetado como tal si sus características (composición, valor nutritivo, contenido en toxinas) hacen que no sea “sustancialmente equivalente” a su homólogo tradicional. Se considera que un nuevo alimento o ingrediente alimentario deja de ser sustancialmente equivalente si una evaluación científica puede demostrar que las características estudiadas son distintas de las que presente un alimento o ingrediente convencional.

Antes de la entrada en vigor del Reglamento 258/97, dos decisiones (EU, 96-97), habían autorizado la comercialización y su uso en alimentación de dos OMG: la soja con resistencia al herbicida glifosato y el maíz con propiedades insecticidas.

Los Comités Científicos habían emitido un dictamen favorable para estos OMGs, que consideraron que no representaban riesgos para la salud ni para el

medio ambiente, y que no existían razones de seguridad para mencionar en el etiquetado de estos productos que se habían obtenido mediante técnicas de modificación genética.

Para estos dos OMG, se estableció un reglamento específico sobre el etiquetado, Reglamento (CE) 1139/98 (EU, 98). Este Reglamento establece la indicación obligatoria en el etiquetado de determinados productos alimenticios fabricados a partir de OMG. La obligación de etiquetar determinados alimentos como “fabricado a partir de soja/maíz modificado genéticamente” según este Reglamento, viene determinada por la presencia de ADN o proteínas derivados de la modificación genética.

El Reglamento 1139/98 ha sufrido modificaciones posteriores, con la finalidad de establecer un umbral mínimo en el contenido de OMG para el etiquetado y, ampliar las normas del etiquetado a los aditivos y aromas que estaban exentos hasta la fecha. Dichas modificaciones se reflejan en el Reglamento (CE) 49/2000 (EU, 2000) y el Reglamento (CE) 50/2000 (EU, 2000). El reglamento 49/2000 señala la obligatoriedad de etiquetar como OMG todos los alimentos cuyos ingredientes contengan más de un 1% de OMG, haciendo referencia tanto a la soja, al maíz como a cualquier otro OMG comercializado en virtud del Reglamento 258/97.

Este umbral del 1% tiene como objetivo excluir la presencia accidental de ingredientes transgénicos en alimentos convencionales, debida a una contaminación involuntaria durante el cultivo, recolección, transporte, almacenamiento y transformación. Los alimentos no están sujetos a los requisitos del etiquetado cuando no hay presencia de ADN ni de proteínas derivados de la modificación genética en sus ingredientes o cuando se encuentran en un porcentaje inferior al 1%.

Con la entrada en vigor del Reglamento 50/2000, los requisitos en materia de etiquetado se hicieron extensivos a los productos alimenticios en cuya composición intervienen aditivos y aromas que contengan o consistan en OMG. Si los aromas o aditivos contienen proteínas o ADN producto de una modificación genética, se debe incluir en la lista de ingredientes la expresión “modificado genéticamente” después del aditivo o aroma.

Posteriormente se publicó el Reglamento (CE) 1829/2003 (EU, 2003) sobrealimentos y piensos modificados genéticamente. Este Reglamento modifica

al Reglamento 258/97 sobre el procedimiento de autorización de alimentos transgénicos, y deroga los Reglamentos 1139/98, 49/2000 y 50/2000, estableciendo unas normas comunes de etiquetado para alimentos y piensos modificados genéticamente.

En materia de etiquetado, este nuevo Reglamento establece la obligatoriedad de etiquetar como OMG aquellos alimentos y piensos cuya composición en OMG (de cada ingrediente) supere el 0,9% si el OMG está autorizado y el 0,5% si no está autorizado, pero ha recibido un dictamen favorable de la Comisión.

Para garantizar el cumplimiento de las normativas referentes al etiquetado de los alimentos transgénicos y hacer posible que las autoridades competentes puedan supervisar el cumplimiento de los Reglamentos, y garantizar la libertad de elección de los consumidores se exige garantizar la identidad preservada (IP) de las materias primas, con la tremenda dificultad que esto conlleva, o el desarrollo de métodos analíticos, capaces de detectar el ADN o las proteínas procedentes de la modificación genética de los vegetales en los alimentos. El incumplimiento de las directrices establecidas por el legislador supondría un fraude alimentario.

1.3.5. Fraudes alimentarios

En 1981, un fraude aduanero, el de importar un aceite comestible disfrazándolo de industrial, se combinó con un refinado incorrecto y con un delito alimentario, vender como de oliva un aceite que no lo era, para provocar la mayor catástrofe alimentaria entre las que se han conocido en nuestro país durante el siglo XX (Tabuenca, 1981).

Es fácil encontrar ejemplos de advenimiento accidental de sustancias tóxicas a nuestros alimentos. Estas contaminaciones suelen ser esporádicas y rara vez se repiten de la misma forma, por lo que son difíciles de prevenir. Así por ejemplo, el caso aludido, conocido como "el del aceite de colza" o del "síndrome tóxico", no tenía precedente y es de esperar que no se vuelva a repetir.

Desgraciadamente no es algo nuevo pues el fraude alimentario va ligado a la producción de alimentos. De hecho, se han encontrado numerosas evidencias, desde sellos falsificados en ánforas romanas que contenían aceite de oliva y vino

(Mello y col., 1982), a documentos históricos con reseñas a ciertos gobernantes de la época, interesados en codificar reglas para proteger a los consumidores frente a prácticas fraudulentas en la venta de alimentos (FAO y OMS, 1999). Aunque no se ha podido datar con precisión la primera adulteración, la historia del fraude alimentario se puede dividir en tres etapas.

La primera se extiende desde el principio de la historia de la Humanidad hasta el siglo XIX. En este periodo la adulteración de los alimentos no supuso ningún problema grave. El hombre consumía lo que la tierra le suministraba, en el lugar y estación precisa.

La segunda etapa comprende todo el siglo XIX y el final de la Segunda Guerra Mundial, etapa en la que la adulteración deliberada fue aumentando, adoptando prácticas tan variadas como la mezcla de ladrillo molido con pimienta o cenizas de soja con té, hasta la adición de arena y polvo de cal al azúcar e incluso agua a la leche, evidentemente era una etapa de escasez alimentaria.

El incremento y gravedad de la adulteración se podría atribuir a la creciente centralización del procesado y distribución de los alimentos y, dado que con esas prácticas se diluía la responsabilidad, los encargados del control alimentario tenían bastantes dificultades para encontrar al responsable del fraude. Por otra parte, la carencia de herramientas analíticas adecuadas para detectar la adulteración permitía que tales prácticas pasaran inadvertidas, con el consiguiente riesgo para la salud del consumidor.

Tras la Segunda Guerra Mundial, los químicos analíticos empezaron a desarrollar procedimientos de análisis con los que minimizar la frecuencia e intensidad de las adulteraciones alimentarias, consiguiendo en los últimos años del siglo XX mejorar notablemente la situación de forma gradual.

La tercera y última etapa abarca las últimas décadas del siglo XX en la que los fraudes detectados son del mismo tipo que los descritos con anterioridad, más los que se generaron a consecuencia de la creciente manipulación de alimentos (Hernández-Rodríguez y Gallego, 1999).

La legislación española se hizo eco de la problemática y comenzó a establecer diferentes normativas para atajar, en la medida de lo posible, el fraude alimentario. Así, coincidiendo con el proceso de asentamiento del Estado liberal comenzaron a establecerse las primeras referencias legislativas en torno al control alimentario. Ya a comienzos del año 1812 la propia Constitución creaba en los

ayuntamientos españoles el cuerpo de policía de salubridad y poco después, señalaba la necesidad de velar por los alimentos. En un principio se desarrollaron diferentes áreas de control desde finales de siglo. En la Real Orden de 5 de enero de 1887 referente a la inspección de los alimentos se establecía la necesidad de vigilar, comprobar y analizar los alimentos, instando a la responsabilidad de las autoridades locales en esta materia y recomendando a los ayuntamientos, el establecimiento de laboratorios químicos municipales (Lafuente, 2009).

Fue en EE.UU., donde se instauró la capacidad para denunciar públicamente determinadas prácticas alimentarias fraudulentas, constatando que la primera denuncia se produjo en 1905. Durante los años posteriores y una vez “liberada la liebre” (metafóricamente hablando), fueron numerosas las acciones emprendidas por los medios de comunicación para alertar a los consumidores sobre determinadas prácticas fraudulentas, focalizadas directamente sobre empresas y productos, consiguiendo resultados inmediatos en las empresas agroalimentarias ante la posible pérdida de cuotas de mercado. La creación de la FDA (*Food and Drug Administration*) dotó al sector alimentario americano de una entidad jurídica, promoviendo junto a Europa en la década de los 60 las primeras manifestaciones institucionales sobre la necesidad de crear una división para proteger a los consumidores, cuyos intereses no estaban representados de igual modo que los de los productores (Jackson, 2015).

Aunque hasta la fecha, la legislación europea no incluye una definición clara de fraude alimentario (Parlamento Europeo, 2014), el fraude sobre un producto alimenticio puede ser definido de manera general, como un acto de mala fe, teniendo por objeto o por defecto, perjudicar los intereses de una o terceras personas que adquieren un producto, pudiendo ser los consumidores, los compradores profesionales (distribuidores o industriales) y, los competidores que colocan el mismo producto en el mercado sin fraude, por tanto, víctimas de una “desventaja de competencia” en relación con el agente económico defraudador.

Por tanto, la “mala fe” es sancionada económica o penalmente, a través de las infracciones o los delitos que pueden no comportar elemento intencional, o civilmente, en el marco de la ejecución de las obligaciones contractuales (Ducauze, 2006).

En general, el fraude alimentario se comete cuando deliberadamente se comercializan alimentos con la intención de obtener ganancias económicas

mediante el engaño al consumidor (Everstine y col., 2013), teniendo diferentes connotaciones.

Así, se da un fraude por sustitución cuando se sustituye total o parcialmente un alimento o ingrediente por otro más barato. Un ejemplo sería el caso detectado en 2008 con la adición de melamina (derivado triazínico rico en N), a la leche para lactantes en China (Zhang y col., 2009), para incrementar su contenido proteico, provocando la génesis de cálculos renales y desequilibrios en el tracto urinario, afectando a 6.244 bebés con más de una centena de decesos. Dentro de este tipo de fraude también se incluye la falsedad en las declaraciones geográficas, de especies y las relativas al origen de la materia prima o el proceso de producción utilizado.

Podemos encontrar también un fraude por adición cuando se añade una sustancia para enmascarar ingredientes de inferior calidad sin informar al consumidor; por ejemplo, en el Reino Unido en 2005 se detectó la adición del colorante Sudan I (prohibido en Europa), para realzar el color a salsas aromáticas (Mazzetti y col., 2004).

Por último, cuando se elimina un componente auténtico y de calidad sin informar al consumidor se produce un fraude por eliminación (Moore y col., 2012).

1.4. ETIQUETADO Y TRAZABILIDAD DE ALIMENTOS

Las fuertes crisis alimentarias vividas por la sociedad europea han provocado que los sistemas de producción, industriales, comerciales y de seguridad existentes, hayan sido puestos en duda y sometidos a presiones sin precedentes, con repercusiones en todos los operadores, sectores económicos, administrativos y políticos, condicionando la realización de un mayor número de controles alimentarios.

Pero la aplicación de normas está directamente supeditada a las prestaciones de las herramientas analíticas disponibles, de ahí que el desarrollo de una metodología capaz de detectar el origen y composición de productos destinados a la alimentación humana y animal, con una exactitud suficiente, de manera sencilla y reproducible, sea esencial para el cumplimiento de los objetivos reguladores y proteccionistas.

Así, las prácticas fraudulentas encaminadas a obtener un margen comercial alto sustituyendo especies de alto valor añadido por otras más económicas; el desarrollo de alimentos procesados que contengan concentraciones de especie inferiores a la declarada, la introducción de carnes o derivados en alimentos destinados al colectivo vegano; la presencia de eventos OMGs o especies no autorizadas en EU o en determinados grupos religiosos, así como las graves repercusiones para la salud derivados de alimentos no aptos para el consumo, ha estimulado el incremento de los controles analíticos a lo largo de toda la cadena de producción y comercialización, para poder garantizar la trazabilidad y tomar acciones correctoras cuando proceda, a ser posible en tiempo real.

El control de la composición de los productos alimentarios se puede llevar a cabo a través de un registro documental y el adecuado etiquetado de los productos e ingredientes desde su origen, pasando por toda la cadena de producción hasta llegar al mercado, englobados en una serie de requisitos y procedimientos para garantizar la IP y en consecuencia la trazabilidad.

Además, será preceptivo el desarrollo y aplicación de protocolos de análisis que posibiliten identificar y/o cuantificar todos los componentes empleados en la elaboración de los alimentos, desde las materias primas hasta el producto final.

La legislación europea actual aborda ambos aspectos, requiriendo la aplicación de sistemas que permitan trazar documentalmete el origen de los productos comercializados, al mismo tiempo que se aumenta el número de procedimientos de ensayo estandarizados para el análisis de alimentos.

Estos requisitos relativos a la trazabilidad y el análisis alimentario fueron espoloados en 1994 a consecuencia de las repercusiones sociales motivadas por los posibles riesgos para la salud y los compartimentos ambientales derivados de la liberación y puesta en el mercado de alimentos y piensos procedentes de cultivos transgénicos (Levidow y Boschert, 2008), y la irrupción de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EBB), o mal de las vacas locas (Creutzfeldt Jakob), considerada la enfermedad de mayor impacto en la historia reciente de la emergencia infecciosa, referida tanto a la Sanidad Animal como a la Salud Pública, por la enorme repercusión sanitaria y de consumo, trascendiendo al plano económico y político de la UE. Esta enfermedad derivada del consumo de carne procedente de animales alimentados con piensos o harinas obtenidas de carne y hueso (MBMs), que contenían proteína animal, se diagnostica por primera

vez en 1986, originando un serio problema económico, así como una perturbación social que llevó al Reino Unido entre finales del año 1994 y principios del 1995 al borde de una moción de censura por parte del Parlamento Europeo (Bradley, 2003).

Con respecto a los organismos modificados genéticamente, ha sido necesario elaborar una serie de protocolos de análisis para poder distinguir entre los autorizados y no autorizados, que permitan incluso en alimentos procesados su detección incluso a niveles traza, ya que como es preceptivo en la EU debe etiquetarse un alimento si la concentración de OMG, atendiendo a la cantidad de este ingrediente y no al peso total del alimento, sobrepasa el 0,9%, requiriendo el desarrollo de métodos de análisis sensibles y robustos (Di Pinto y col., 2008; Miraglia y col., 2004). Sin embargo, el enorme crecimiento experimentado en la producción de OMGs junto con el aumento significativo en el número y diversificación genética de los eventos GM producidos, hacen necesario el desarrollo de estrategias analíticas de *screening* asequibles en tiempo y coste, requisitos que cumplen las técnicas moleculares (Holst-Jensen y col., 2012), basada en la detección de proteínas, ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y ADN, PCR® (*Polymerase Chain Reaction*).

La prohibición impuesta por la UE de utilizar proteínas, exceptuando las procedentes de peces, en la alimentación animal controló de forma eficaz la propagación de la epidemia de EEB (Frezza y col., 2008), impulsando además el desarrollo de métodos más precisos para la identificación y/o cuantificación de especies en alimentos y piensos para el ganado, generándose la necesidad de verificar el etiquetado en los productos alimenticios, con la aplicación de métodos que permitan la detección de concentraciones traza de carne de vacuno en cualquier alimento, incluso en los sometidos a procesado. Así, se han desarrollado diferentes protocolos de análisis que permiten detectar ADN de mamífero en general, y vacuno en particular, incluso cuando el ADN está altamente degradado debido a los procesos de transformación, amplificando pequeños fragmentos de 66 y 76 pares de bases (pb), respectivamente (Brodmann y Moor, 2003).

Con respecto a las especies animales o vegetales que pueden aparecer en un alimento, puede requerirse identificar su presencia o ausencia o bien, determinar la concentración exacta para corroborar que se ajusta a los niveles declarados en la etiqueta (Ghovvati y col., 2009). Diferentes estudios revelan con relativa

frecuencia un etiquetado incorrecto tanto en materia prima como en productos sometidos a tratamiento térmico o congelados, que si bien eventualmente puede deberse a errores fortuitos, en la mayoría de ocasiones son intencionados y motivados por intereses económicos.

Los avances en el desarrollo de técnicas analíticas han permitido desvelar la verdadera dimensión del problema, sacando a la luz prácticas cada vez más sofisticadas. Así, la aplicación de técnicas inmunoquímicas a un total de 902 productos cárnicos muestreados en diferentes superficies comerciales, permitió detectar que el 22% de las muestras procesadas y el 15% de las no procesadas contenían especies animales no declaradas en el etiquetado (Hsieh y col., 1995). También ha sido posible la detección de fraudes en el etiquetado de productos procesados (Flores-Munguia y col., 2000), y piensos (Dalmasso y col., 2004), aplicando la técnica de inmunodifusión, basada en la formación de bandas de precipitación en geles de agarosa del complejo antígeno-anticuerpo.

Años más tarde se realizó un estudio similar (Ayaz y col., 2006), detectando de nuevo porcentajes incorrectos en el etiquetado, cercanos al 20%, respondiendo con frecuencia a la sustitución de carne de ternera por carne de ave, lo que nos indica que no debemos despreocuparnos del tema, ya que, aunque atendiendo a las repercusiones para la salud aparentemente el problema no reviste gravedad, estas prácticas incumplen a todas luces, los requisitos de etiquetado y trazabilidad y la lealtad en las transacciones comerciales, al darnos “gato por liebre”.

En otro estudio basado en la detección de ADN mediante la técnica de PCR en muestras de carne picada, salchichas y fiambre se llegó a resultados similares, detectándose en estos alimentos procesados la adición fraudulenta de ADN de aves de corral no declaradas en el 40% de las muestras de salchichas, y el 30% de las muestras de fiambre analizadas (Ghovvati y col., 2009).

Dentro de la industria cárnica también podemos encontrar fraudes en alimentos de especies que provienen de la caza como el ciervo, jabalí o perdiz y cuyo comercio, aunque escaso, su precio de venta es relativamente alto, detectando con cierta frecuencia ADN de especies de menor valor comercial criadas en granjas (aves, cerdo y cabra), en estos productos (Zha y col., 2010).

El problema del etiquetado incorrecto y el consiguiente fraude está más extendido en productos más habituales como la leche y derivados lácteos como el queso, donde la adición de leche de vaca, de menor valor, a la de cabra, oveja o

búfala, de mayor valor comercial, es una práctica muy frecuente (Mininni y col., 2009), pudiendo provocar graves repercusiones en la salud de los consumidores debido a la sensibilización y manifestación posterior de alergias a consecuencia de ciertas proteínas presentes en la leche bovina a porcentajes mayores. En cuanto a los productos pesqueros, la gran variedad de estas especies dificulta su reconocimiento, especialmente en el caso de alimentos procesados térmicamente o congelados, exponiendo al consumidor a numerosos fraudes comerciales y a posibles repercusiones en su salud, ya que habitualmente estas especies proceden de países en vías de desarrollo. Así, la OCU ha recomendado recientemente cierta cautela a la hora de adquirir pescados congelados, ya que en lugar de mero merluza o lenguado, probablemente estemos comprando perca, tilapia o panga procedentes de acuíferos lejanos de África y Asia, contaminados con fitosanitarios prohibidos en la EU como la trifluralina o con elevadas concentraciones de metales pesados, superiores a la DDA recomendada (Bargar y col., 2017).

La legislación europea obliga a identificar en los productos pesqueros frescos todas las especies por sus nombres comerciales específicos, sin embargo, no es tan estricta con los procesados, permitiendo denominar a las especies de una forma genérica. Las evidencias encontradas quizás surtan efecto e impliquen una reconsideración legislativa, ya que una recopilación de estudios científicos sobre casos de sustitución en productos pesqueros, revela hasta veinticuatro informes afectando a una veintena de especies diferentes (Puyet y Bautista, 2009). Recientemente, un informe realizado por el grupo Oceana en 2016 vuelve a evidenciar la gravedad del problema a nivel mundial ya que, de las 25.000 muestras de productos del mar analizadas, una de cada cinco estaba mal etiquetada, por lo que compramos y consumimos pescados y mariscos que no son lo que creemos. El estudio pone de relieve datos de algunos países que son verdaderamente alarmantes. Así, en Italia el 82% de las 200 muestras de mero, perca y pez espada que se analizaron estaban mal etiquetadas, y más del 50% eran sustituidos por tipos de peces que aunque exóticos, podían ser perjudiciales para la salud. En Bélgica se encontró que el 98% de los 69 platos de atún rojo que servían los restaurantes tenía más bien poco de atún; lo mismo sucedió en Santa Mónica (California), donde detectaron dos locales de sushi que vendían carne de ballena como si fuese atún.

Aunque nuestro país no escapa a las prácticas fraudulentas, los resultados no son tan alarmantes, ya que el proyecto Labelfish situó el fraude en pescado fresco o congelado en España en un 4,9%, encontrando mayores fraudes con respecto al atún que en la media de los países europeos. A nivel europeo, el menor fraude se da en el lenguado (2,89%), el bacalao (3,5%) y el eglefino (3,7%). Respecto al atún, el fraude se sitúa en torno al 6,88%; en la anchoa, en un 15,5%, y en la merluza, en un 11,1%. Pero como veremos a continuación, el fraude no es exclusivo de las especies animales.

El mercado de zumos de frutas procesadas es muy importante, ya que por las excelentes propiedades nutricionales de las frutas, se les considera alimentos saludables y más del 50% de la población toma un zumo de naranja en el desayuno. Solo en Gran Bretaña alcanza 1 millón de Euros, llegando a los 12 millones en EE.UU. Ello ha dado lugar a que entre los zumos de frutas, el de naranja sea el de mayor elaboración y consumo, principalmente a partir de concentrado. Países como Brasil y EE.UU., suministran el 85% del zumo que se consume en el mundo, destacando Florida, que procesa para la fabricación de zumos el 95% de su producción de naranjas.

En Europa los tres principales productores, España, Italia y Grecia, producen una cantidad de zumo que no cubre la demanda europea, por lo que se recurre a importaciones de concentrados de naranja de Brasil y de EE.UU., detectando numerosos casos de concentrados de naranja con porcentajes de mandarina superiores al 10%, lo cual, supondría un fraude alimentario (Esturo, 2008), como establece el Real decreto 1050/2003 de 1 de agosto en su parte 5, en el que se regula la obligatoriedad de indicar en la etiqueta todas las frutas utilizadas, en orden decreciente, según el volumen de los zumos o purés de frutas utilizados para elaborar el zumo.

La adulteración más frecuente en el zumo de naranja es debida a la dilución con agua, ya que es enmascarada mediante la adición de azúcar, ácido cítrico o colorante, entre otros aditivos legales o no. Otras formas de adulteración responden a la adición de pulpa en lugar de zumo o la de zumos y/o pulpas procedentes de otras frutas, habitualmente otros cítricos como la mandarina, ya que representa un 36% de la producción nacional de cítricos y ésta proporción continúa aumentando cada año. Una pequeña porción de los excedentes de mandarina se comercializan como zumo directo, por lo que es factible suponer

que una gran parte de la producción total está siendo añadida fraudulentamente al zumo de naranja, práctica ampliamente extendida en Brasil. Ésta última forma de adulteración está adquiriendo una gran relevancia, paliando así las fluctuaciones en las cosechas de naranjas en cuanto a cantidad y calidad.

Independientemente de la aplicación de criterios de trazabilidad, los organismos encargados de la salud pública y defensa del consumidor, así como los departamentos de control de calidad tanto de empresas agroalimentarias como las encargadas de poner en el mercado alimentos y piensos, requieren el desarrollo y aplicación de métodos analíticos más fiables, que permitan verificar la composición de los productos utilizados o comercializados.

La normativa relacionada con el etiquetado de alimentos en general en la EU (Reglamento Europeo (CE) 104/2000 y 2065/2001) y en España (Real Decreto 121/2004 y 1380/2002 para productos congelados), ha sido objeto de diferentes revisiones que la hacen cada vez más restrictiva y exigente, con el objetivo de garantizar la trazabilidad en toda la cadena de producción de alimentos. El Real Decreto 1334/1999, de 31 de Julio, aprobaba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios en España (Boletín Oficial del Estado, 1999). Esta norma general de etiquetado fue modificada posteriormente por el Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre (Boletín Oficial del Estado, 2004).

El Parlamento Europeo dio un paso más allá para normalizar el etiquetado de los productos para el consumo, con la implantación de una normativa común relativa a la obligatoriedad de declarar los ingredientes (QUID: QUantitative Ingredient Declaration), recogido en la Directiva del Parlamento Europeo CE 13/2000, obligando no sólo a identificar las especies utilizadas en la elaboración de un determinado producto, sino también a especificar la cantidad de cada una de ellas (EU, 2000).

La normativa sobre trazabilidad de los productos alimenticios se inició con el reglamento CE nº 178/2002 (EU, 2002). En él se define el concepto de trazabilidad como “la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, la transformación y distribución de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinada a ser incorporada en alimentos o piensos o con probabilidad de serlo”, de aplicación y obligado cumplimiento en todas las industrias alimentarias, que

deben diseñar estrategias apropiadas que permitan, en todo momento, realizar el seguimiento y control desde su origen hasta el punto de venta de todos los ingredientes y aditivos, lotes, origen geográfico y empresas productoras y procesadoras, que han participado en la fabricación y transporte del producto. Así, una vez establecidas las normas y protocolos que permitan el seguimiento exhaustivo de todos los materiales y procesos que sigue un producto desde su origen hasta su destino, y con la correcta aplicación de los sistemas de documentales de trazabilidad, debería ser posible verificar sin el menor problema el etiquetado correcto, tanto en productos frescos como procesados. Sin embargo, estos sistemas no están siempre disponibles para todos los productos, siendo particularmente difíciles de llevar a la práctica en productos importados de países terceros, donde la trazabilidad no es de obligado cumplimiento.

En consecuencia, el fenómeno de la globalización de la industria y la permeabilidad del comercio internacional de alimentos ha despertado una preocupación en los productores, consumidores y la propia administración pública respecto a la autenticidad, requiriendo el establecimiento de controles adicionales y el desarrollo de metodologías de análisis que permitan detectar niveles traza y con capacidad de respuesta rápida.

1.5. METODOLOGÍAS DISPONIBLES PARA COMBATIR EL FRAUDE

Las técnicas de análisis empleadas habitualmente para combatir el fraude deben ser exactas y sensibles para detectar los compuestos diana a los umbrales legislados. Además, y dada la complejidad y diversidad de matrices alimentarias, deben presentar una selectividad adecuada para llevar a cabo los ensayos sin interferencias de la matriz alimentaria, que podrían dar lugar a resultados erróneos.

Los procesos analíticos actuales utilizados para la identificación y detección de especies animales y vegetales en alimentos se engloban en tres categorías en función del tipo de molécula diana: *i*) las técnicas basadas en el análisis de proteínas (bioquímicas), *ii*) las basadas en la determinación de ADN (génicas) y; *iii*) otras técnicas físicas y químicas (Georgiou y Danezis, 2017) que recogen información de la muestra distinta de ADN y proteína (**Figura I.6**).

Si bien los métodos basados en el análisis de proteínas han sido hasta la fecha los más utilizados por su sencillez, rapidez y versatilidad, en los últimos años encontramos numerosas aplicaciones genéticas en seguridad alimentaria, motivadas por los grandes avances logrados en el desarrollo de técnicas de biología molecular.



Figura I.6: Técnicas a emplear para la detección de fraudes alimentarios.

Los métodos basados en el análisis de proteínas utilizados habitualmente para la identificación de especies animales y vegetales se centran en la detección de proteínas o de patrones proteicos específicos de especie, y engloban técnicas de electroforesis, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acopladas a detectores adecuados (espectrometría de masas), y diferentes formatos de inmunoensayo. En general, la identificación de proteínas específicas de una determinada especie se basa en las propiedades físico-químicas de la cadena polipeptídica, la carga eléctrica total de la secuencia de aminoácidos, el tamaño y estructura tridimensional, así como el grado de reconocimiento de los epítomos específicos.

1.5.1. Métodos inmunoquímicos

Lo que hoy se conoce como técnicas inmunoanalíticas o inmunoensayos, engloba todas aquellas herramientas analíticas que utilizan como principio básico la interacción anticuerpo-antígeno (Ab-Ag). Tienen su origen en el área de la química clínica. El primer IA cuantitativo, un radioinmunoensayo (RIA) para el análisis de insulina humana a niveles de picogramos, fue descrito por Yalow y Berson en 1959 (Yalow y Berson, 1959). El desarrollo de los RIA abrió la posibilidad de que la reacción Ag-Ab pudiera ser utilizada como base para el desarrollo de nuevos métodos analíticos de alta sensibilidad y selectividad. Así, en la década de los 70, Ercegovich sugirió el empleo de métodos inmunoquímicos para el *screening* de residuos abióticos (Ercegovich, 1971), que sirvió de base para el desarrollo de otros basados en el mismo principio. Sin embargo, la peligrosidad inherente al uso de isótopos radioactivos hacía necesario que los ensayos se realizaran en laboratorios especialmente equipados, lo que suponía un gran inconveniente. La solución definitiva a la intensa búsqueda de IA no radioactivos vino propiciada por la demostración de que las enzimas podían ser acopladas a Ab y Ag (Avrameas y Uriel, 1966), y por la observación de que los Ags y Abs podían ser fácilmente inmovilizados sobre soportes plásticos (Engvall y Perlmann, 1971), lo que supuso el desarrollo de una nueva técnica conocida como ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Esta aportación, junto a la realizada por Hammock (Hammock y Mumma, 1980), supuso la génesis del desarrollo de numerosos inmunoensayos enzimáticos (EIA) para una gran variedad de compuestos abióticos y bióticos, aumentando espectacularmente su aceptación a partir de 1988. El factor determinante de estos métodos consiste en el desarrollo y obtención de haptenos, conjugados y anticuerpos, de los que dependerá tanto la sensibilidad como la selectividad del ensayo.

Los anticuerpos forman parte del sistema de defensa de los animales vertebrados y son proteínas globulares (Ig) del grupo de las γ -globulinas, cuya masa molecular oscila entre 150.000 y 900.000 daltons (**Figura I.7**).

El 70-75% de las inmunoglobulinas del suero humano son inmunoglobulinas del tipo G (IgGs), con la estructura típica en forma de Y. Básicamente, las IgGs están compuestas por la asociación de cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Dos de las cadenas se

denominan pesadas (H) y son idénticas, mientras que las otras dos son ligeras (L) y también iguales; así pues, los anticuerpos son moléculas bifuncionales, es decir, poseen dos sitios de reconocimiento para el antígeno.

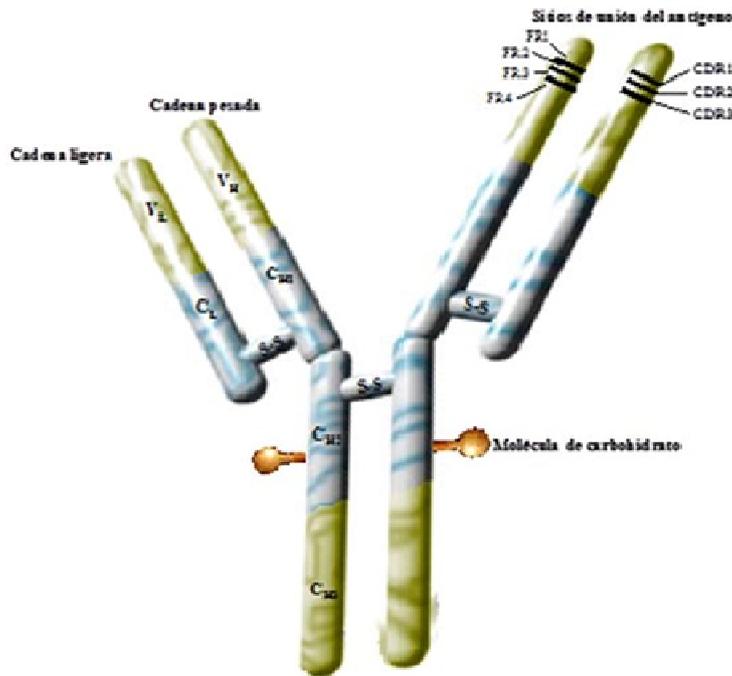


Figura I.7: Estructura básica de las inmunoglobulinas G (IgGs). VL región variable de la cadena ligera; VH región variable de la cadena pesada; CDR1, CDR2, CDR3 regiones hipervariables; FR1, FR2, FR3, FR4 regiones estructurales; CL región constante de la cadena ligera; CH1, CH2 CH3 regiones constantes de la cadena pesada.

Fundamentalmente, las IgGs se dividen en dos regiones: (1) dominios de unión, responsables de la interacción con los antígenos y conocidas también como región variable (V) y (2) dominios efectores, que sirven de anclaje a los receptores de determinadas células y cuya secuencia de aminoácidos se mantiene constante (C) para cada especie animal.

Los sitios de reconocimiento específicos y activos del anticuerpo (parátomos) hacia el antígeno (epítipo) se forman por la asociación de fragmentos de la región variable de las cadenas H y L en el extremo amino terminal. Las regiones variables de ambas cadenas se organizan en tres regiones hipervariables o

determinantes de complementariedad (CDRs), separadas por cuatro regiones estructurales (FR).

La producción de Abs se realiza fundamentalmente inmunizando animales de sangre caliente, como por ejemplo conejos, cabras, ratones o pollos (Hock y col., 1995a). Los anticuerpos aislados de muestras de sangre de animales inmunizados son por naturaleza policlonales (pAbs); consisten en una población heterogénea de inmunoglobulinas, algunas de las cuales reconocen los sitios antigénicos o epítomos del inmunógeno. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales (mAbs) son poblaciones homogéneas de inmunoglobulinas secretadas por clones de una célula de hibridoma, resultado de la fusión de una célula de mieloma inmortal con un linfocito B procedente de un animal inmunizado. La tecnología del hibridoma garantiza la producción ilimitada de mAbs con propiedades constantes (Hock y col., 1995b).

Sin embargo, la producción de mAbs necesita un equipamiento especial, material y medios de cultivo celulares bastante caros, además de personal altamente cualificado, por lo que en la mayoría de IAs se emplean pAbs.

La mayoría de moléculas objeto de estudio poseen una baja masa molecular, inferior a 5.000 daltons, por lo que no son capaces de inducir una respuesta inmune. Así pues, deben acoplarse a una molécula carrier, generalmente una proteína, para estimular la producción de Abs. La posición óptima de acoplamiento a la molécula carrier, el número de haptenos unidos a la misma y el protocolo seguido, determinarán la sensibilidad y selectividad de los Abs resultantes (Szurdoki y col., 1995).

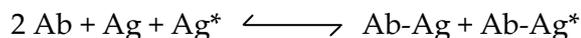
Las proteínas carrier más utilizadas incluyen fracciones de globulinas, albúminas de suero de diferentes especies, hemocianina, ovoalbúmina, tiroglobulina y fibrinógeno. Como carrier no proteico también se han utilizado liposomas o dextrano (Buiting y col., 1992). La proteína del molusco *Megathura crenulata* (KLH) es frecuentemente considerada como un excelente carrier, dado que es ajena al sistema inmune de los vertebrados.

Los criterios para elegir una proteína u otra se basan en su poder inmunizante (cantidad de determinantes antigénicos), solubilidad y facilidad de conjugación. Por ello, es importante establecer el número óptimo de haptenos unidos a la proteína carrier -densidad de epítomos óptima-. Habitualmente, las proteínas altamente sustituidas proporcionan los mejores resultados. Para la

albúmina de suero bovino (BSA) son deseables relaciones molares (RM) hapteno/proteína entre 10/1 y 20/1, mientras que para moléculas de mayor tamaño como la KLH, deben obtenerse RM en el intervalo 800/1-1.000/1.

Una vez obtenidos los Abs, el siguiente paso es el desarrollo del inmunoensayo propiamente dicho. Dada la amplitud del concepto, el número de posibles configuraciones que puede adoptar un IA es ciertamente enorme, hasta el punto de que su clasificación y terminología, no exenta de discrepancias, se convierte en ocasiones en un obstáculo para los propios especialistas.

El desarrollo de inmunoensayos también se ve condicionado por el hecho de que la mayor parte de los analitos de interés son moléculas de bajo peso molecular. La principal consecuencia práctica es que los inmunoensayos en disolución son casi exclusivamente de tipo competitivo. Como se puede apreciar en la siguiente reacción inmunoquímica, un inmunoensayo competitivo o de saturación es aquel en el que el analito (Ag) y una forma marcada del mismo (Ag*) compiten por los sitios específicos de unión de una cantidad limitante de Ab.



Apoiados en este concepto general, los IA se pueden desarrollar en fase homogénea, donde no es preciso separar los componentes libres de los inmunocomplejos formados (Porstmann y Kiessig, 1992).

Aunque estos ensayos son simples, rápidos y automatizables, al no producirse la separación de las especies libres de los complejos formados, sufren interferencias debidas a la matriz que, generalmente, limitan la sensibilidad del mismo, lo que representa una gran desventaja desde el punto de vista analítico. Por ello, los IAs más empleados son los desarrollados en fase heterogénea, que están basados en la separación de las especies libres de las unidas tras la formación del inmunocomplejo, previamente a la medida de la actividad de la marca (Hage, 1995).

El protocolo de ensayo va a depender de la especie inmovilizada sobre la fase sólida, del modo en que se efectúe la detección y del orden de adición de los reactivos implicados, dando lugar a distintos tipos de configuraciones.

En las configuraciones de anticuerpo inmovilizado (AI) la competición se establece entre el analito presente en la muestra y un trazador o analito marcado, por los sitios de unión del anticuerpo. En la variante de conjugado (hapteno unido a la proteína carrier) inmovilizado (CI), la competición se establece entre el analito en disolución y el inmovilizado, por los sitios específicos de unión de los anticuerpos.

La molécula utilizada para la detección de la interacción Ab-Ag debe cumplir una serie de requisitos tales como: elevada actividad, facilidad de detección, compatibilidad con un amplio rango de medios de reacción y condiciones de ensayo, facilidad de conjugación a anticuerpos o antígenos, no requerir precauciones especiales durante su manipulación, disponibilidad a un bajo coste, y finalmente, que tanto su detección como la interpretación de los resultados sean los más sencillos posibles. Entre la gran variedad de marcadores existentes, los más utilizados son, sin duda alguna, los enzimáticos, ya que no emplean material radioactivo, se alcanzan bajos límites de detección y son los que mejor se ajustan a los requisitos arriba señalados (Tijssen, 1997).

Las buenas propiedades mostradas por las enzimas, el gran número de substratos disponibles y la versatilidad del método de detección, hacen de estas moléculas unos marcadores muy apropiados. Este hecho, unido a que en teoría se puede producir anticuerpos frente a cualquier sustancia orgánica e inorgánica, hacen de los inmunoensayos -en particular los EIA- una técnica útil, eficaz y versátil para su aplicación al análisis cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo de gran cantidad de sustancias.

Por otro lado, la selección del material para la inmovilización de los inmunorreactivos es uno de los aspectos más relevantes y comprometidos relacionados con el desarrollo de IAs, ya que determina el formato de ensayo a utilizar, la sensibilidad y el sistema de detección a emplear.

Los materiales comercialmente disponibles presentan una composición química y una geometría muy heterogénea. Las características y propiedades más importantes que deben presentar los soportes destinados a la preparación de superficies bioactivas son: porosidad y tamaño adecuado, estabilidad química, alta capacidad de inmovilización, disponibilidad comercial a bajo coste, presentar grupos funcionales reactivos, y baja o nula reacción inespecífica. Habitualmente, los IAs se desarrollan en placas de plástico de 96 pocillos, que facilitan la

separación de inmunorreactivos en la etapa de lavado. También se presentan en forma de tubos o micropartículas.

Las microplacas presentan, comparativamente, baja capacidad de inmovilización, y muestran una baja relación entre el área superficial y el volumen. Las fases sólidas particuladas son muy eficientes, ya que favorecen la dispersión a través de la mezcla de reacción, presentan una relación área superficial/volumen bastante alto, exhiben facilidad y alta capacidad de inmovilización, buenas propiedades mecánicas e hidrodinámicas, y están disponibles sin funcionalizar o químicamente derivatizadas, permitiendo la unión tanto del antígeno como del anticuerpo en una gran variedad de modos de inmovilización.

Las membranas, son otro tipo de soporte utilizado en IAs. Actúan como barrera física discriminando las especies por tamaño y polaridad, y, además, no presentan problemas de empaquetamiento; sin embargo, la mayoría de las membranas comercialmente disponibles presentan baja estabilidad de inmovilización, fácil colmatación y problemas relacionados con señales de fondo elevadas, lo que se traduce en una disminución de la relación señal-ruido. A pesar de ello, las membranas son un material válido y con potencial para otro tipo de aplicaciones inmunológicas. En este sentido, las membranas microporosas son ampliamente utilizadas para el desarrollo de inmunoelectrodos, sistemas de inmunofiltración y dipsticks, actuando como fase sólida para inmovilizar inmunorreactivos (Yim y col., 1993). El principio del ensayo es el mismo que en los inmunoensayos clásicos realizados en placa, con la ventaja de que los períodos de incubación son mucho más cortos. Además, las membranas ofrecen un área mayor que las superficies plásticas tradicionales, y las distancias a recorrer por las especies bioactivas desde el seno de las disoluciones hasta la interfase sólido-líquido son menores. A través de la aplicación de medidas de reflectancia, es posible establecer una relación proporcional entre la cantidad de analito presente en la muestra y la luz reflejada. De este modo, la posibilidad de efectuar medidas fotométricas mediante un detector portátil, apoya el empleo de estos dispositivos para realizar ensayos en el lugar donde pueda presentarse el problema.

En los IAs competitivos en fase heterogénea la cantidad de marca unida a la fase sólida (señal) es inversamente proporcional a la del analito objeto de análisis (**Figura I.8**). Cuando se representa la señal obtenida frente al logaritmo de la

concentración de analito, se obtiene una curva de calibrado típica dosis-respuesta que presenta una pauta sigmoide.

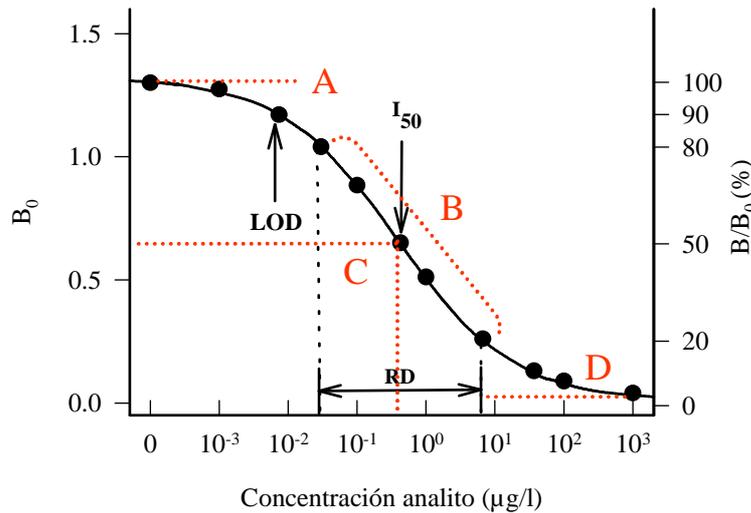


Figura I.8: Curva sigmoide típica dosis-respuesta.

En este caso, el ajuste matemático de la curva de calibrado obtenida para diferentes concentraciones de analito, responde a la siguiente ecuación:

$$\text{Señal} = \frac{A - D}{1 + (x/C)^B} + D$$

donde A representa la asíntota máxima, que corresponde a la señal en ausencia de analito; D es la asíntota mínima y corresponde a la señal en exceso de analito; B es la pendiente de la curva en el punto de inflexión; x es la concentración de analito; y C, el valor de la concentración de analito en el punto de inflexión (Grojtan y Keel, 1996). Este punto es utilizado para estimar la sensibilidad del inmunoensayo (I_{50}).

Los parámetros más característicos de la curva de calibrado son los siguientes: señal en ausencia de analito (B_0); señal debida a los estándares (B); límite de detección (LOD), que corresponde a la menor concentración de analito

que produce una señal distinguible de la correspondiente a B_0 para una determinada muestra y con cierto grado de confianza.

Con frecuencia se define como la concentración de analito que reduce entre el 10-20% de los sitios específicos de unión de anticuerpo y se calcula restando al valor de B_0 dos o tres veces la desviación estándar. La I_{50} es la concentración de analito que reduce el 50% de los sitios específicos de unión del anticuerpo y el intervalo de trabajo (RD) el rango de concentración de analito que reduce los sitios de unión específicos del anticuerpo entre el 20-80%. Dentro de este intervalo, las variaciones de señal se relacionan linealmente con la concentración de analito y pueden obtenerse resultados cuantitativos en muestras reales con relativa precisión.

Por otro lado, los IAs también se caracterizan por su alta selectividad. Así, la selectividad de un anticuerpo se define como la capacidad para reconocer exclusivamente un determinante antigénico.

En este sentido, un anticuerpo es específico cuando sustancias con estructura y composición semejante al analito no son reconocidas. La selectividad o reactividad cruzada (RC) se determina, habitualmente, comparando la I_{50} dada por el analito de interés con las obtenidas con otros compuestos de estructura similar. Este parámetro se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$RC = \frac{I_{50} \text{ (analito)}}{I_{50} \text{ (interferente)}} \times 100$$

Cuando el valor RC es menor del 10% se considera que el anticuerpo es específico, y si es menor del 1% muy específico. El hecho de que un Ab muestre un valor elevado de RC (baja selectividad) hacia compuestos relacionados estructuralmente con el analito, es considerado como una desventaja. Sin embargo, ese Ab puede ser utilizado para propósitos de *screening*, obteniendo así un valor global para una familia de compuestos.

La aplicación de técnicas inmunoquímicas aplicadas al análisis de alimentos debe resolver un aspecto clave: el tratamiento de muestra. En general, las muestras acuosas son analizadas mediante IA sin pretratamiento, excepto la eliminación de material particulado y el ajuste del pH y fuerza iónica, en caso necesario. Sin embargo, para muestras sólidas y matrices complejas como

alimentos, es necesaria una mayor preparación de muestra antes de proceder a su análisis mediante inmunoensayo. Así, en el desarrollo de un nuevo método inmunoquímico hay que tener en cuenta las recomendaciones dadas por los métodos de referencia respecto a los procedimientos de preparación de muestra, en cada matriz y para cada tipo de analito.

Si bien las primeras aplicaciones de la técnica ELISA para la detección y cuantificación de especies animales (vaca, oveja, caballo, canguro, cerdo y camello) en mezclas datan de 1982, (Fukal y Kas, 1989), alcanzando umbrales de detección del 3% de las especies citadas en mezclas, desde hace algunos se vienen desarrollando inmunoensayos y comercializando kits para la detección de fraudes en alimentos, basados en los principios de la técnica ELISA, generalmente en formato de Ab inmovilizado; que pueden ser cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos y difieren en los formatos de presentación -tubos de ensayo, placas de 96 pocillos, tiras reactivas, etc., (Giovannacci y col., 2004). Además, permiten la determinación rápida y simultánea de un elevado número de muestras, que unido a su fácil transporte, precisión y sensibilidad, hacen que su uso sea ideal para análisis en campo o en línea de fabricación.

Así, es posible detectar las especies más comunes de la industria cárnica y láctea, con los kits ofertados por Zeu-inmunotec y Elisa Technologies para materia prima y procesadas a temperaturas inferiores a 100 °C, encontrando también en el mercado kits para la detección de alérgenos, sustancias bióticas y abióticas (van Hengel, 2007; Micheline y col., 2008) y para OMG, validado por el JRC (Joint Research Center, Centro Común de Investigación de la Comunidad Europea), específico para la detección de soja Roundup Ready™, tolerante al glifosato (Lipp y col., 2000). El método está basado en la detección de la proteína que le confiere tolerancia al herbicida. La sensibilidad de este método es de 0,3%-5% para materias primas (semillas de soja).

A pesar de las excelentes prestaciones de los métodos basados en proteínas presentan ciertos inconvenientes, ya que estas propiedades nativas pueden perderse o modificarse drásticamente durante el procesado del alimento o la adición de aditivos que induzcan a la desnaturalización proteica o la proteólisis, imposibilitando su detección (González y col., 2000). En ocasiones la presencia de proteínas homologas a la proteína diana puede inducir la generación de falsos positivos ante la imposibilidad de detectar polimorfismos que no impliquen

cambios en secuencia de aminoácidos, lo cual afecta sobre todo a la discriminación entre variedades o especies próximas. Además, algunas técnicas descritas presentan un elevado coste y su manejo no es rutinario reduciendo su aplicabilidad.

Conviene además tener presente que los métodos analíticos basados en la detección de proteínas no pueden aplicarse a aquellos OMG obtenidos mediante la denominada tecnología antisentido, ya que la modificación genética no produce una nueva proteína, sino una supresión de la expresión de una proteína nativa. Además, no es posible utilizar estas técnicas si la proteína transgénica no se expresa en los tejidos de la planta que son utilizados en los alimentos o su expresión está por debajo del límite de detección.

Actualmente, muchas investigaciones se dirigen hacia la resolución de todas estas limitaciones y los resultados que se van obteniendo auguran soluciones viables a corto plazo.

1.5.2. Métodos genéticos

Los métodos genéticos utilizados para identificar especies animales, vegetales e incluso microorganismos se basan en la detección de secuencias de ADN únicas para cada especie. Además, y al contrario que ocurre con los marcadores proteicos, la búsqueda de dianas de ADN presenta una serie de ventajas.

Como todos sabemos, el ADN se encuentra en todas las células y todos los tejidos de un individuo y es idéntica, por lo que su detección no depende del tejido que se analice o a partir del que se ha elaborado el alimento. Sin embargo, las proteínas se expresan a consecuencia de la actividad génica, que puede diferir en función del tejido, la etapa del desarrollo del individuo, el ambiente e incluso de la estación del año, no siendo viable en consecuencia su detección si la proteína no se expresa en los tejidos del individuo utilizados en los alimentos, o dificultando el análisis si su expresión está por debajo del límite de detección del método aplicado.

Además, otra ventaja proviene de la degeneración del código genético al existir más codones que aminoácidos. Si un aminoácido está codificado por más de un triplete, el ADN aportará mayor información, dada su mayor variabilidad

(Lockley y Bardsley, 2000a). Por ello, a la hora de abordar la identificación de especies es importante tener en cuenta que las regiones de ADN diana deben acumular mutaciones a una velocidad adecuadamente rápida para que las especies filogenéticamente muy próximas, presenten diferencias en las secuencias de nucleótidos para poder así diferenciarlas; pero para que tales diferencias no aparezcan dentro de la misma especie, a su vez la velocidad ha de ser lo suficientemente lenta, debiendo alcanzar una velocidad de equilibrio o de compromiso. Además, el ADN es térmicamente estable, soportando incluso elevadas temperaturas propias de los procesos de elaboración de conservas, donde si bien las proteínas se desnaturalizan y degradan, el ADN sólo se fragmenta, experimentando una reducción de tamaño próxima a 100-200 pb, longitud suficiente para su análisis posterior (Mackie y col., 1999), ya que la información de la secuencia de los fragmentos obtenidos sigue siendo útil.

Los principales métodos de detección e identificación de especies en alimentos están basados en la detección del ADN mediante la técnica de PCR, que consiste en la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN a partir de cantidades muy pequeñas de ADN inicial. De esta forma, se pueden generar millones de copias de un fragmento concreto a partir de una población muy pequeña de moléculas de ADN, lo que permite su detección y análisis posterior, y los datos de secuencia pueden evaluarse atendiendo a distintos niveles de especificidad, desde grupos o especies hasta incluso variantes o modificaciones genéticas de individuo. Se trata pues de una técnica altamente sensible, rápida y específica (Lockley y Bardsley, 2000a).

En los últimos años, los sistemas de detección e identificación basados en ADN han tenido un desarrollo espectacular, que se fundamenta en la secuenciación y publicación posterior del genoma de muchos organismos en bases de datos de libre acceso, y a las mejoras alcanzadas en cuanto a sensibilidad y fiabilidad en los métodos de amplificación, complementado en unos casos o sustituyendo en otros, a las técnicas basadas en proteína, sin olvidar que como cualquier técnica analítica no están exentas de inconvenientes. A pesar de ello, los métodos basados en ADN son bastante precisos y versátiles, adaptando con facilidad las aplicaciones optimizadas a otras especies, pudiendo además incorporar nuevos desarrollos provenientes de la investigación genómica. Entre las desventajas más relevantes destacamos su elevado coste y la relativa facilidad

con la que se pueden contaminar las muestras con DNAsas o ADN exógeno, éste último puede ser amplificado dando lugar a falsos positivos. En ese sentido hay que extremar las precauciones separando zonas e incluyendo diferentes controles para asegurar resultados de calidad.

Al ser técnicas relativamente nuevas, en ocasiones se requiere cierta formación y cualificación del personal tanto para el desarrollo de las técnicas como en la interpretación de resultados, requisitos que pueden considerarse como un obstáculo o desventaja. En cuanto a la elección de la técnica génica a emplear, dependerá del problema a resolver, el coste, el número de muestras a analizar y la disponibilidad de personal y medios materiales.

1.6. METODOLOGÍAS BASADAS EN LA AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE ADN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

La estandarización de métodos de identificación de especies a partir de cebadores (o *primers*) específicos, ha sido posible por el incremento de la información genómica disponible en las bases de datos, facilitando la búsqueda de polimorfismos susceptibles de ser usados para el correcto diseño de cebadores específicos de especie. Estos cebadores amplificarán ciclo a ciclo siguiendo las condiciones de PCR previamente optimizadas, sólo si en la muestra problema está presente el ADN de la especie para los que han sido diseñados, obteniendo resultados en un corto período de tiempo; aunque en ocasiones puede requerirse la digestión de los fragmentos con enzimas de restricción o bien, la secuenciación del producto amplificado.

En determinadas situaciones es factible comprobar la presencia de diferentes especies en la muestra de forma simultánea, combinando en la misma reacción (máster mix), los cebadores específicos con un homólogo común a varias especies. En el diseño del cebador genérico (no selectivo), se utilizará una zona de la secuencia que sea común a todas las especies a analizar, siendo imprescindible que tenga una localización estratégica, para poder discriminar los fragmentos generados por la presencia en la muestra de distintas especies en función del tamaño de los mismos (Lockley y Bardsley, 2000a). En base a estas premisas se han descrito en la bibliografía diferentes aplicaciones multiparamétricas para la

detección de especies usadas habitualmente en alimentación (Lockley y Bardsley, 2000b; Matsunaga y col., 1999; Meyer y col., 1994).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamenta en la amplificación *in vitro* del ADN, pudiendo obtener microgramos de ADN a partir de cada molécula inicial (Saiki y col., 1988). Su funcionamiento es similar al de una fotocopiadora biológica, pudiendo duplicar (amplificar) ciclo a ciclo, cualquier fragmento de ARN o ADN, siempre que se conozcan las secuencias flanqueantes con las que puedan hibridar los oligonucleótidos complementarios, que actúan como cebadores para que la polimerasa (sastre biológico), pueda copiar (coser), las hebras molde insertando los nucleótidos de forma correcta. La eficiencia del proceso de PCR será una variable importante a optimizar en base a las concentraciones individuales de cada componente de la reacción, temperatura y tiempo, ya que, si esta es baja, se reducirá considerablemente la cantidad final de amplificado, por ejemplo si esta disminuye en cada ciclo un 5%, en un proceso de 25 ciclos se alcanzará sólo la mitad de producto esperado. Así, en primer lugar, habrá que optimizar los parámetros críticos de la PCR, haciendo especial hincapié en el diseño y selección de los cebadores, la concentración del ión magnesio, las temperaturas y tiempos de cada ciclo, sin olvidar la importancia que tiene la extracción del ADN molde de muestra a utilizar en el ensayo (Ling y col., 1991).

Las condiciones de amplificación van a influir sobremanera en la calidad de los resultados de la PCR, por lo que deben controlarse adecuadamente los siguientes parámetros, prestando especial atención al diseño de los cebadores, la calidad y concentración del ADN molde, la presencia de inhibidores o de contaminaciones cruzadas, la concentración de magnesio, el tipo y la cantidad de enzima ADN polimerasa y el programa de amplificación; para asegurar la exactitud, reproducibilidad y repetitividad intra e inter laboratorios (Edwards y Gibbs, 1994), así como la evidenciación de resultados erróneos (falsos negativos y falsos positivos).

Para asegurar la ausencia de contaminaciones durante el proceso de análisis y comprobar que los reactivos y equipos utilizados en la reacción de amplificación funcionan correctamente, se incluirán una serie de controles negativos y positivos, respectivamente (Kocher y Wilson, 1991):

a) Control negativo (CN): Incluiremos una reacción que contenga todos los reactivos menos el ADN molde para verificar la ausencia de ADN contaminante

en todos los reactivos empleados en la master mix (o coctel de reacción). La contaminación puede deberse a una molécula de ADN remanente de un proceso previo, a una contaminación cruzada con otra muestra, a un operador que no trabaje con disciplina, o incluso a ciertos microorganismos que puedan estar presentes en el ambiente.

b) Control de extracción (CEx): Se prepara una muestra procedente de una extracción realizada con agua destilada en lugar de muestra, para corroborar la ausencia de ADN en las soluciones de extracción o detectar una posible contaminación de ADN en el ambiente.

c) Control positivo (CP): En ella se utiliza ADN molde conocido, para comprobar el funcionamiento correcto del proceso de extracción y amplificación.

d) Control de inhibición (CI): Reacción en la que además de utilizar el ADN de la muestra problema, se le adiciona una cantidad conocida de ADN control que amplifique con los cebadores, permitiendo detectar así si la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra de ADN molde, y es muy útil para descartar la aparición de falsos negativos.

La reacción PCR es compleja en la práctica, ya que si bien la concentración de los nucleótidos libres y cebadores disminuye a medida que avanzan los ciclos, la cantidad de producto obtenido va aumentando, dando lugar a que se establezca una competencia de unión entre los cebadores complementarios y los productos, provocando que el proceso eventualmente se aproxime al agotamiento, alcanzando un comportamiento asintótico, donde la cantidad de producto no aumenta, por lo que el número óptimo de ciclos dependerá de la concentración inicial de ADN una vez optimizada la reacción de PCR (Innis y col., 1999).

Llegados a este punto, debemos tener también en cuenta ciertos errores intrínsecos a la propia naturaleza de la enzima Taq polimerasa, pudiendo dar lugar a sustituciones de bases (cada $1,1 \times 10^{-4}/\text{pb}$) o modificaciones estructurales y mutaciones en una de cada $2,4 \times 10^{-5}/\text{pb}$, originadas probablemente por la pérdida de actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ en la enzima purificada, limitando así la aplicabilidad de la PCR.

Sin embargo y para nuestro sosiego, un error en $1,1 \times 10^{-4}/\text{pb}$ es insignificante; pero si consideramos 30 ciclos de amplificación por PCR, tendríamos un error cada 300 pb de producto. Obviamente, estos errores serían

observables si la amplificación se hiciera partiendo de una sola molécula de ADN; afortunadamente, en la reacción de PCR se suele partir habitualmente de cientos de moléculas de ADN, dando lugar a errores muy bajos, del orden de 0,3% de los productos, no siendo observables (Tindall y Kunkel, 1988).

1.6.1. Diseño de cebadores y sondas

Esta es una etapa crucial para el adecuado funcionamiento del proceso de PCR y la amplificación específica de la región del ADN diana, que debe estar limitada por oligonucleótidos que hibriden correctamente, por lo que la secuencia de ADN debe ser conocida, o al menos predecible con un 90% de confianza en las regiones donde va a hibridar el cebador (Lockley y Bardsley, 2000a). Para un correcto diseño, la identificación molecular debe focalizarse a zonas del genoma lo suficientemente significativas, para poder discriminar la especie diana de otras especies muy próximas, ya que la variación genética a lo largo del genoma de una especie no es constante.

A la hora de seleccionar el tipo de gen objetivo en el que centrar nuestros diseños, debemos tener en cuenta que la tasa de mutación en el ADN mitocondrial de los animales es superior a la del nuclear, siendo por tanto los genes mitocondriales unos candidatos idóneos para la identificación de especies (Brown y col., 1979), y analizar las diferencias entre individuos dentro de las mismas especies o estrechamente relacionadas, ya que presentan un grado de homología suficiente para poder diseñar cebadores comunes a varias especies, así como posiciones variables intercaladas, adecuadas para el diseño de sondas específicas.

Pero esto no quiere decir que no podamos hacer diseños correctos sobre genes estructurales nucleares para diferenciar especies (Carrera y col., 2000), ya que utilizando éstos como marcadores complementarios de los genes mitocondriales, permite el diseño de cebadores y sondas comunes a un mayor número de especies, consiguiendo métodos más versátiles y fiables.

Sin embargo, dado que la cantidad de ADN mitocondrial en las muestras a analizar es aproximadamente 10^6 copias superior al nuclear, se ha estandarizado el empleo de ADN mitocondrial para la identificación de especies (Teletchea y col., 2005). Como estrategia alternativa al empleo de ADN mitocondrial se plantea

el empleo secuencias repetidas comunes en ciertas regiones de ADN nuclear procedentes habitualmente de retrotransposones, SINES y LINES (*short y long interspersed nuclear elements*), abundantes en el ADN nuclear de eucariotas, que aglutinan un elevado número de copias, siendo adecuados, por localizarse en el núcleo, para detectar pequeñas cantidades de ADN por PCR, evitando así la variabilidad inherente al número de mitocondrias por célula, dependiente de tejido, encontrando en la bibliografía algunos desarrollos para la identificación de especies basados en estas secuencias (Mendoza-Romero y col., 2004; Walker y col., 2003).

Para estudios de filogenia, los genes mitocondriales del citocromo b (*cytB*) y la COXI (subunidad uno de citocromo c oxidasa) son los más utilizados, ya que presentan regiones conservadas sobre las que diseñar cebadores “universales” para amplificación de un amplio número de especies. También presentan regiones variables, que son adecuadas para poder identificar por secuencia (a nivel de especie), y para el diseño de cebadores específicos de especie (Kocher y col., 1989). A pesar de ello, para la identificación de individuos, variedades o la procedencia, se aconseja utilizar la región de control *D-loop* del ADN mitocondrial al poseer mayor variabilidad (Góngora y col., 2004), siendo también factible el empleo de secuencias de ADN nuclear como microsatélites (Cunningham y Meghen, 2001; Nielsen y col., 2001), o bien polimorfismos localizados en genes que presentan alguna característica diferenciadora de la variedad o raza diana (Maudet y Taberlet, 2002). En ocasiones se ha utilizado como marcador diferencial de vertebrados, la combinación tRNA*Glu* y *cytB* del genoma mitocondrial mediante RFLP (Kingcombe y col., 2001).

Con respecto al diseño de los cebadores para conseguir la especificidad de especie, se ha evidenciado que el extremo 3' del cebador es un parámetro crítico en la reacción de amplificación. En condiciones normales de reacción, se inhibirá la amplificación si se produce un desapareamiento del nucleótido situado en ese extremo. Por ello se han descrito diferentes métodos en la bibliografía que permiten la discriminación de especies filogenéticas muy próximas (Kwok y col., 1990; Lockley y Bardsley, 2002a), utilizando cebadores específicos que incluyen cambios de base en el extremo 3', que revelan que, dependiendo del carácter y posición relativa, los desapareamientos en la región interna del cebador van a afectar a su especificidad.

Además, las hibridaciones con cambios en los nucleótidos Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) y Guanina (G) tales como A-A, G-A, A-G, C-C, provocan una reducción de la amplificación, bastante más acusada que la originada por otros cambios como A-C, C-A, T-G, G-T (Stadhouders y col., 2009). En general, los cebadores que contienen los nucleótidos T, C o G en el extremo 3', son más específicos que los que contienen A, ya que en este caso pueden amplificar al margen de los nucleótidos del ADN molde. Si la especificidad depende del penúltimo nucleótido, la eficiencia de la reacción de amplificación se reduce considerablemente si el nucleótido es Adenina (Ayyadevara y col., 2000). Por otra parte, un desapareamiento en la zona central del cebador lleva asociado un efecto bastante más acusado en la temperatura de anillamiento que cuando los desapareamientos ocurren en las zonas laterales (Rennie y col., 2008).

1.6.2. Extracción de ADN molde

La extracción del ADN a partir de los alimentos es un paso crucial para la aplicación posterior de cualquier método de análisis, en especial en las técnicas basadas en la PCR. El resultado del ensayo dependerá, en gran medida, de la cantidad y la calidad del ADN extraído, pudiendo encontrarse tanto en estado mono o bicatenario (doble cadena). En general, para la reacción de PCR no es necesario disponer gran cantidad ni calidad de ADN.

Los alimentos son muestras muy heterogéneas, y pueden contener sustancias que, de no ser eliminadas durante la extracción de ADN, pueden inhibir las reacciones posteriores de amplificación y afectar en gran medida a los resultados derivados de su análisis. Por otra parte, es importante conocer el origen de las muestras en alimentos procesados, ya que es más difícil obtener cantidades significativas de ADN para realizar análisis posteriores, ya que el tratamiento térmico, la presión o los cambios de pH, provocan una degradación parcial de este ADN o fragmentaciones que pueden afectar la amplificación al producirse fragmentos de menor tamaño que el amplicón. De hecho, en conservas de atún, carnes procesadas o lecitinas de soja, no se ha logrado amplificar fragmentos de más de 200 pb (Frezza y col., 2003; Prado y col., 2004; Quinteiro y col., 1998). En ocasiones es deseable una ligera fragmentación del ADN ya que se

facilitaría la desnaturalización de la muestra, favoreciendo así el acceso del cebador y la polimerasa.

La cantidad de ADN a emplear en cada reacción de PCR puede oscilar, desde unos microgramos a cantidades tan bajas como el procedente de una sola célula (Zhang y col., 1992). Por ello no se considera determinante la cantidad de ADN a utilizar, requiriendo sólo la presencia de una cadena intacta de ADN que incluya la región a amplificar y donde las impurezas, si las hay, estén lo suficiente diluidas para no inhibir la reacción de polimerización. En la práctica, el número mínimo de copias de secuencia diana para poder detectar el amplificado dependerá de la sensibilidad del método y las condiciones de reacción (Teletchea y col., 2005).

La cantidad de óptima de ADN para la reacción de PCR es de 10-200 ng. Un exceso de ADN en la reacción puede dar lugar a artefactos (amplificaciones inespecíficas), e incluso puede llegar a inhibir el proceso de amplificación. El rendimiento de ADN puede variar en función de la naturaleza de la muestra y del método de extracción aplicado, aconsejando por ello la estandarización de la concentración de ADN molde a utilizar en los ensayos (Park y Crowley, 2005), cuantificando previamente la cantidad de ADN de cadena doble o simple aplicando cualquiera de los métodos que se describen a continuación:

a) Electroforesis en gel de agarosa: se basa en la visualización de la intensidad de las bandas de las muestras con las de concentraciones conocidas mediante el empleo de programas que integran algoritmos para el procesado de imágenes bidimensionales, que están sustituyendo a aquellos que analizaban la banda sólo en una dimensión (Bajla y col., 2005).

b) Espectroscopia UV-Vis: Permite determinar la concentración de ácidos nucleicos en una solución mediante la medida de la absorbancia a 260 nm. El principal inconveniente de esta técnica es que no es específica; así que cualquier ADN (diana o fruto de una contaminación cruzada), absorberá luz ultravioleta sobrevalorando el resultado y dando resultados erróneos, no siendo viable la diferenciación entre ADN monocatenario y nucleótidos de ADN bicatenario. La relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm se utiliza habitualmente para determinar la contaminación de ADN con proteínas, en particular, los aminoácidos aromáticos, ya que estos absorben luz a 280 nm (García-Segura y col., 1996).

c) Espectroscopia de fluorescencia: más selectiva que la anterior y requiere el empleo de agentes intercalantes fluorescentes como SYBR®Green o PicoGreen® que se unen al ADN de doble cadena, comportándose de forma similar al bromuro de etidio, y permiten detectar hasta 25 pg/mL de ADN (Enger, 1996).

1.6.3. Componentes clave de la reacción de PCR

La secuencia y longitud de los cebadores o *primers* son características esenciales para la reacción de PCR pues actúan como punto de partida para que la enzima polimerasa alargue sus extremos 3', copiando la secuencia complementaria del ADN de la muestra con la que previamente han hibridado. Además, definen los extremos 5' del fragmento amplificado (producto corto de la reacción) ya que es la última base que puede copiar la enzima. En la elección de la secuencia, hay que tener en cuenta varios factores, como evitar motivos repetidos que pueden hibridar de forma incorrecta con el ADN molde. También hay que evitar la presencia de secuencias invertidas, que pueden dar lugar a la formación de estructuras secundarias en el cebador y disminuir la eficacia de la PCR. Es importante también, evitar la presencia de secuencias complementarias entre los dos cebadores ya que puede favorecer la formación de dímeros de cebadores frente a la hibridación con el ADN molde, lo que produce una disminución de la eficacia de la PCR.

La longitud de los cebadores es una característica muy importante que determina en gran medida la especificidad de la reacción. Si los cebadores son cortos, la probabilidad de que hibriden con secuencias del ADN que no deseamos es mayor. Tampoco deben ser excesivamente largos, pues la probabilidad de que formen estructuras secundarias y dímeros de cebadores aumenta. La longitud óptima para los cebadores es de 20-30 nucleótidos, adecuada para tener en el genoma una zona homóloga específica con la que hibridar de forma estable a la temperatura de anillamiento (Kocher y Wilson, 1991). Así, se seleccionan los cebadores teniendo en cuenta los siguientes criterios (Saiki y col., 1988):

a) El contenido en los nucleótidos G y/o C debe aproximarse al 50% para facilitar la unión del cebador al ADN molde a una temperatura lo suficientemente alta para impedir las uniones inespecíficas.

b) Se evitará en la medida de lo posible secuencias largas de una sola base, y secuencias que puedan dar lugar a estructuras internas secundarias o sean complementarios entre sí, fundamentalmente en los extremos 3', ya que podrían dar lugar a dímeros de cebadores (o *primer-dimer*, en versión anglosajona). Al hibridarlos extremos 3' de los cebadores, se forman estos dímeros reduciendo su concentración en la reacción y en consecuencia, la eficiencia de la reacción de amplificación.

c) También se evitará la presencia de tres G ó C en la proximidad del extremo 3'.

La secuencia y longitud de los cebadores determinan la temperatura a la que debe realizarse la hibridación en la PCR. Aunque hay determinadas fórmulas matemáticas que permiten calcular esta temperatura en base a la secuencia y la longitud del cebador, siempre es necesario realizar ensayos previos de optimización para determinar que temperatura de hibridación es la óptima para una amplificación concreta.

La distancia entre los cebadores (es decir, el tamaño del amplificado), va a determinar en gran medida la sensibilidad de la PCR y en principio, pueden estar muy separados en el genoma ya que la reacción permite amplificar fragmentos de una longitud de varias kilobases. En el análisis del ADN procedente de alimentos por PCR, es fundamental que el tamaño del amplificado sea pequeño (100-150 pb). Debido a la degradación que sufre el ADN durante procesado de los alimentos, la probabilidad de amplificar fragmentos de 100-150 pb es mayor que la de amplificar fragmentos de mayor tamaño, por ello en la práctica se seleccionan las posiciones más próximas que permitan los métodos de análisis, ya que la amplificación es más eficiente y robusta cuanto menores el tamaño del amplicón, mejorando la sensibilidad de la técnica cuanto menor es el tamaño de los amplificados.

Habitualmente, en la reacción se utilizan concentraciones bajas de cebadores, entre 0,1 y 1,0 μM , disminuyendo así el riesgo de formación de productos inespecíficos y dímeros de cebadores, ya que concentraciones superiores pueden provocar el inicio de las reacciones no deseadas en lugares ectópicos y la amplificación de secuencias no diana, siendo la reacción de PCR extremadamente ineficaz, cuando es limitante la concentración del cebador.

Con respecto a la enzima, la mayoría de métodos de identificación descritos utilizan la Taq ADN polimerasa que es una enzima termoestable capaz de incorporar progresivamente nucleótidos desde el extremo 3' de un cebador por su actividad 5'→3' exonucleasa. Al no poseer actividad exonucleasa 3'→5' no puede eliminar los nucleótidos que no están insertados correctamente en la nueva cadena formada. Además, presenta una actividad transferasa terminal que ajusta un solo nucleótido (A, habitualmente), a los extremos 3'-OH del fragmento amplificado.

En el mercado podemos encontrar dos tipos de Taq polimerasa: la enzima nativa aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* y la expresada en la bacteria *E. coli* utilizando la ingeniería genética (Myers y Gelfand, 1991), que presenta algunas características mejoradas respecto a la nativa.

También podemos adquirir otras variantes comerciales, como la denominada AmpliTaq®, una forma modificada por ingeniería genética de la enzima diseñada para Hot-Start PCR. Esta polimerasa sólo se activa cuando permanece a 95 °C durante 7-10 min, impidiendo así la unión de cebadores no específicos y la síntesis de dímeros de cebadores al inicio de la PCR a bajas temperaturas.

La enzima ADN polimerasa requiere de un tampón específico para realizar correctamente su actividad enzimática, así como una concentración óptima de ión magnesio (Mg^{2+}) en la mezcla de reacción, que debe oscilar entre 1,5 y 5 mM (Kocher y Wilson, 1991), ya que puede afectar a la reacción de PCR por los siguientes motivos: i) hibridación del cebador con el ADN molde; ii) variación de la temperatura de disociación de las cadenas de ADN molde como la de los productos de la PCR (disminuyendo la especificidad); iii) a la continuidad de la actividad de la enzima ADN polimerasa. Hay que tener en cuenta que la ausencia de Mg^{2+} puede inactivar la enzima y el exceso, compromete la fiabilidad de la PCR al incrementar la posibilidad de uniones inespecíficas y la formación de dímeros de cebadores (Eckert y Kunkel, 1990). Si bien la mayoría de métodos de identificación de especies por PCR descritos utilizan una concentración de Mg^{2+} 2,5 mM, las condiciones particulares de hibridación requeridas en algunos casos obligan a optimizar su concentración experimentalmente.

Es importante también descartar la presencia de reactivos en la solución de ADN molde, que puedan formar complejos con este catión divalente, como ocurre con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y otros quelantes que pueden mermar la cantidad de Mg^{2+} libre, enmascarando la concentración óptima de Mg^{2+} requerida para la reacción (Innis y col., 1999). Para la polimerización de las cadenas de ADN molde se requiere la presencia en el medio de nucleótidos (dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato). La concentración estándar de los nucleótidos en la reacción es de 200 μM (cada uno). Es importante que los cuatro se encuentren a la misma concentración para evitar errores en la polimerización.

Con respecto al número de ciclos necesario para producir un fragmento visible en un gel de agarosa tras la PCR a tiempo final (reacciones de identificación), o poder cuantificar en base a las diferencias en los valores de fluorescencia (PCR a tiempo real); depende de la cantidad de ADN diana inicial, es decir, la cantidad de ADN que contiene la secuencia que se quiere amplificar. Generalmente, 40 ciclos son suficientes para detectar 10-50 copias de ADN diana (Kennedy y Oswald, 2011).

Además, para estandarizar el proceso de amplificación se requiere el empleo de un termociclador, equipo que permite realizar de forma automática los distintos pasos que componen la reacción de PCR. En estos termocicladores se suceden las subidas y bajadas de temperatura que se requieren para las distintas fases de la reacción (**Figura I.9**).

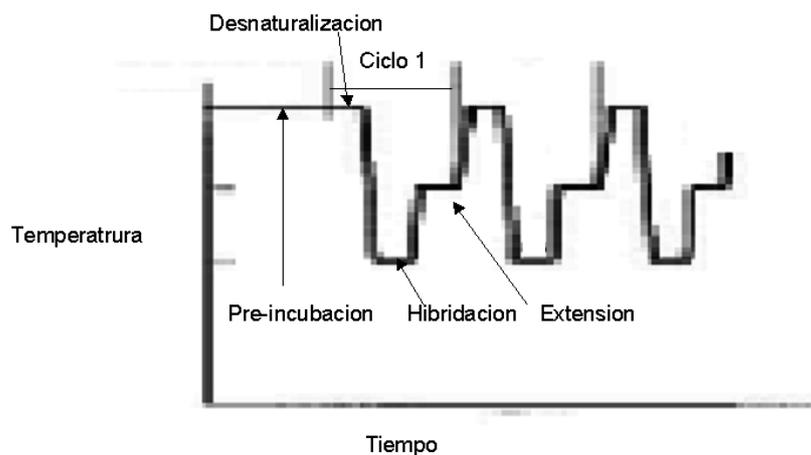


Figura I.9: Perfil de temperaturas característico de una PCR.

En el mercado encontramos una gran variedad de termocicladores, cuya diferencia principal radica en el mecanismo utilizado para producir el enfriamiento y calentamiento del bloque donde se encuentran las muestras (habitualmente aire o resistencia eléctrica).

1.6.4. PCR a tiempo final

El descubrimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) por K. Mullis y colaboradores en 1987 (Mullis, 1990), supuso una auténtica revolución en la biología molecular, ya que es posible obtener millones de copias de un gen en unas pocas horas, independientemente de su origen (virus, bacterias, plantas, animales); siendo por ello una técnica prácticamente imprescindible en muchas áreas como la biomedicina, la biología forense, la agricultura, la ganadería, la microbiología, etc.

Por ejemplo, en biología forense la utilización de la PCR es insustituible, ya que el estado del ADN que se debe analizar en estos casos hace inviable la utilización de otras técnicas alternativas. La amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN mediante la PCR, es un proceso que consiste en ciclos repetidos de:

i) Desnaturalización del ADN, etapa en la que se separan las dos cadenas que forman el ADN, de forma que el ADN pasa a estar en forma de cadena simple. Esta separación se consigue a temperaturas elevadas (93-96 °C);

ii) Hibridación de dos cebadores (*annealing*), con la secuencia complementaria del ADN previamente desnaturalizado. Esta hibridación tiene lugar al bajar la temperatura (50-65 °C). Los cebadores son oligonucleótidos relativamente cortos (20-30 nucleótidos), con secuencias distintas entre sí y complementarias a las secuencias que limitan el fragmento de ADN que se va a amplificar;

iii) Extensión, mediante la formación de una cadena nueva de ADN tras la incorporación sucesiva de nucleótidos a cada uno de los cebadores. Esta extensión tiene lugar generalmente a 72 °C, y está mediada por la enzima ADN polimerasa (habitualmente Taq ADN polimerasa), que requiere la presencia de iones Mg^{2+}

(Figura I.10). La polimerización de la nueva cadena tiene lugar en la dirección $5' \rightarrow 3'$.

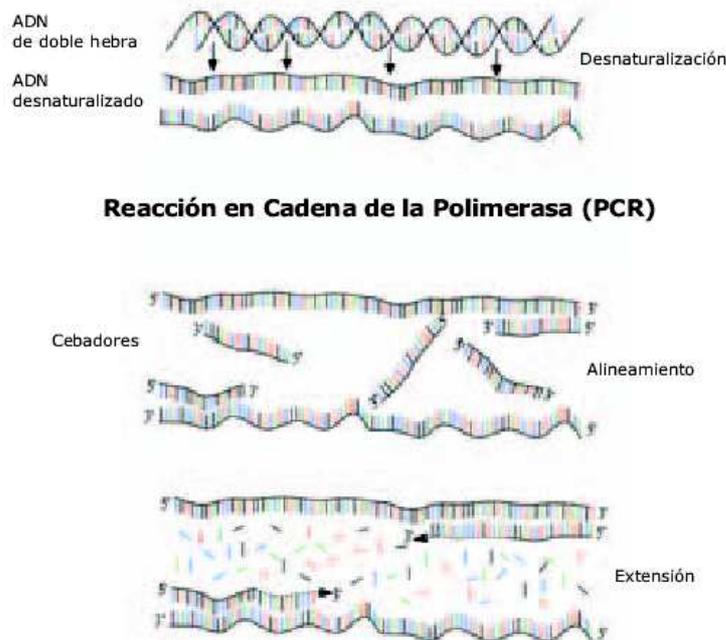


Figura I.10: Proceso de PCR. Las dos cadenas que forman el ADN se separan a temperaturas elevadas. Posteriormente, al bajar la temperatura, tiene lugar la hibridación de los cebadores con la secuencia homóloga del ADN desnaturalizado. Al incubar a 72°C , la polimerasa incorpora nucleótidos a los cebadores. El resultado es la obtención de una copia del ADN original.

Los procesos de desnaturalización, hibridación y extensión constituyen un único ciclo en el proceso de la PCR. Este ciclo se repite entre 30-40 veces y en cada ciclo se duplica el número de copias de ADN, ya que cada cadena de ADN sintetizada "de novo" sirve de molde para el ciclo siguiente. Por tanto, el proceso de PCR es exponencial, generándose millones de copias a partir de un número pequeño de copias de ADN inicial (**Figura I.11**). Acabada la amplificación, para visualizar el ADN y determinar su tamaño, se utiliza la electroforesis horizontal en gel de agarosa y tinción posterior con bromuro de etidio, reactivo que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN, sin preferencia por la secuencia.

Una vez unido a la hélice de ADN, puede absorber luz UV a 300 nm y emitir luz en el espectro visible. Mediante la electroforesis en geles de agarosa, se pueden separar fragmentos de ADN no separables por otros métodos como la centrifugación en gradientes de densidad. La sensibilidad para detectar ADN mediante la tinción con bromuro de etidio es de 20 pg.

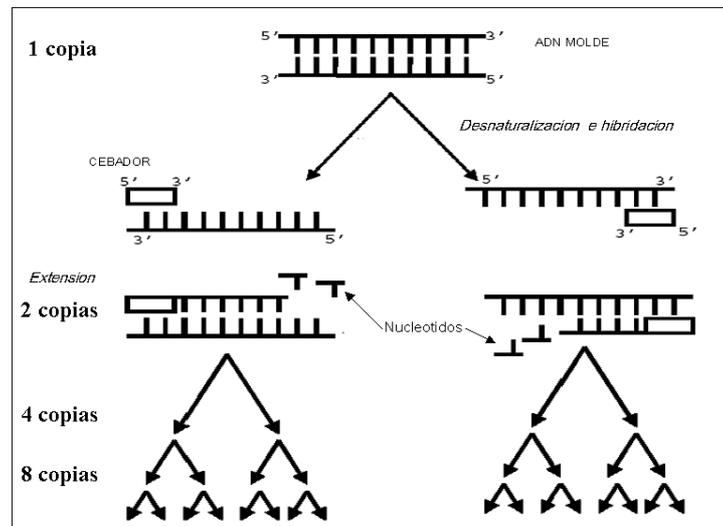


Figura I.11: Amplificación exponencial del ADN durante la PCR.

Al ser una técnica tan versátil, puede aplicarse a la detección de material transgénico en alimentos amplificando regiones geonómicas que son comunes a la mayor parte de los OMG desarrollados hasta el momento.

Las plantas modificadas genéticamente contienen tres elementos genéticos exógenos esenciales: el transgén y dos secuencias que modulan y permiten la correcta síntesis y expresión del transgén (promotor y terminador; **Figura I.12**).



Figura I.12: Elementos genéticos introducidos en los OMG.

Por ello, la detección de cualquiera de estos tres elementos genéticos es la base para la detección de un OMG por PCR en alimentos. La amplificación de estos elementos genéticos comunes se denomina método de *screening* y nos permite determinar la presencia o ausencia de OMG en un alimento (**Figura I.13**).

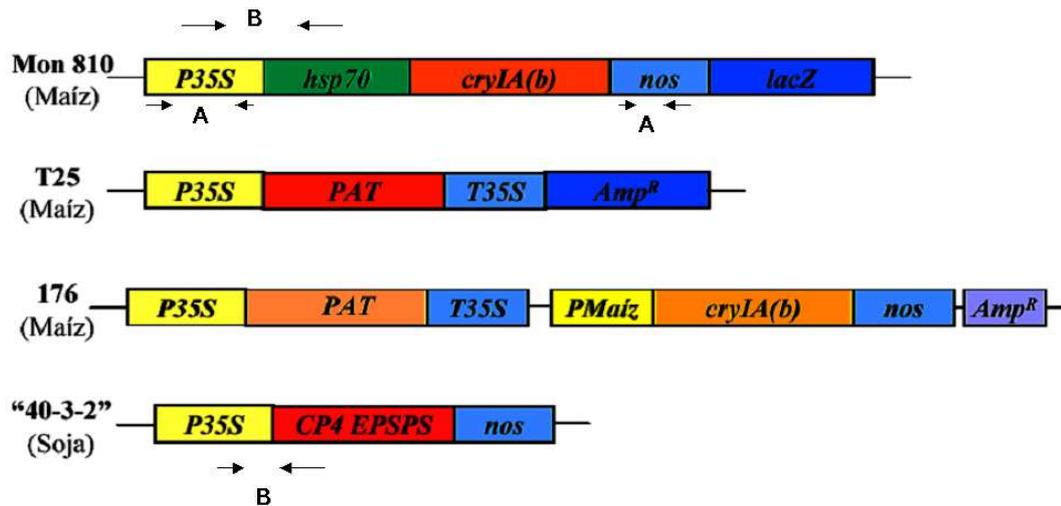


Figura I.13: Construcciones genéticas específicas de distintos OMG. A: Reacción de *screening*. B: Reacción de identificación.

Habitualmente, las regiones geómicas que se amplifican para la detección de OMG son el promotor P-35S procedente del CaMV (virus del mosaico de la coliflor) y el terminador NOS, procedente de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Estos dos elementos reguladores se encuentran en la mayor parte (> 95%) de los vegetales modificados genéticamente.

El primer método sometido a pruebas de validación a nivel europeo para la detección de OMG en alimentos, fue un método de *screening* utilizando como dianas P-35S y NOS, tanto en materias primas como en alimentos procesados.

Con la detección por PCR de secuencias de P-35S y T-NOS en una muestra, se puede determinar la presencia o ausencia de un OMG, pero no se puede identificar la variedad concreta. Sin embargo, la PCR también puede utilizarse para llevar a cabo esta identificación, eligiendo para amplificar las regiones geómicas adecuadas (**Figura I.13**). Esto se realiza detectando una construcción

genética particular, específica de cada una de las variedades. La PCR de identificación, nos permitirá determinar si el OMG detectado en el alimento está autorizado o no para su distribución y consumo en la UE.

La versatilidad y especificidad de la técnica de PCR permite llevar a cabo reacciones para detectar más de una secuencia denominadas múltiplex, que requieren el empleo de dos o más pares de cebadores en el mismo tubo de reacción, de este modo se amplifican simultáneamente varios segmentos del ADN diana, pudiendo detectar e identificar a la vez varios genes de interés. Para ello se debe optimizar las concentraciones de los reactivos como la concentración de magnesio, cebadores y el tipo y la cantidad de la enzima ADN polimerasa, así como el programa del termociclador, para poder detectar cada diana sin inhibir la de las demás (Vet y Marras, 2005). Atendiendo a los cebadores, se minimizará en la medida de lo posible el número requerido mediante el diseño de un cebador común y otro específico de las especies a determinar (Weibin y col., 2009).

1.6.5. PCR en tiempo real

Las técnicas basadas en PCR son rápidas y específicas y muy sensibles, generando millones de copias de un fragmento a partir de una cantidad muy pequeña de ADN, permitiendo su detección y análisis posterior, algo inviable por otros métodos de análisis. En ocasiones, la marcada sensibilidad se puede convertir en una desventaja competitiva cuando la legislación relativa al etiquetado admite cierto grado de contaminación. Con frecuencia los detractores de las técnicas basadas en la PCR utilizan este argumento para limitar su aplicación y estandarización, ya que podrían dar falsos positivos originadas por presencia de trazas de la secuencia diana (Sawyer y col., 2003), requiriendo conocer la cantidad en la muestra, tal y como establece la Norma UNE-EN ISO 17025, que entre otras disposiciones recomienda que la expresión de los resultados del análisis, se den en forma cuantitativa.

Estas limitaciones estimularon el desarrollo de la PCR en tiempo real o Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), puesta a punto en 1993 (Higuchi y col., 1993), cuyo empleo se ha estandarizado en los últimos años, pudiendo incluso determinar la viabilidad de ciertos microorganismos patógenos aplicando etapas de tinción y bloqueo del ADN de las células muertas (Elizaquível y col.,

2012), permitiendo el seguimiento continuo de los productos de amplificación del ADN a medida que van transcurriendo los ciclos de PCR.

Se basa en la detección de fluorescencia asociada a cada ciclo de amplificación de la reacción de PCR, cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto generado en la reacción, pudiendo establecer una cinética del incremento de fluorescencia de la que se pueden obtener datos cuantitativos, absolutos o relativos, del número de copias de ADN molde presente inicialmente en la mezcla de reacción (Brodmann y Moor, 2003). Además, el ciclo de amplificación que se establece para analizar los resultados de amplificación (ciclo umbral, C_T), asegura que ningún componente de la mezcla de reacción limita el transcurso de la misma, por lo que la amplificación se encuentra en su fase exponencial (Heid y col., 1996), donde teóricamente, en cada ciclo se duplica la cantidad inicial del ADN diana (asumiendo un 100% de eficiencia).

La PCR en tiempo real se ha convertido en la tecnología más ampliamente utilizada para la detección y cuantificación de ADN, ya que permite automatizar el proceso acortando el tiempo total de análisis, mejora la especificidad, sensibilidad y precisión al realizar las medidas en un estado de amplificación temprano (Bustin y col., 2005), permite mayor rendimiento de muestra y no requiere etapas post-amplificación, reduciendo el tiempo de ensayo, así como la variabilidad en el resultado y las posibles contaminaciones por amplicones, ya que eliminamos el análisis electroforético de los productos amplificados, etapa imprescindible en la PCR a tiempo final (Wong y Medrano, 2005).

Además, se pueden diseñar amplicones muy cortos gracias al empleo de sondas o intercalantes fluorescentes, fundamental cuando se trabaja con muestras de ADN deterioradas procedentes de alimentos procesados o incluso de la medicina forense (Wittwer y col., 1997b).

Las sondas fluorescentes se comportan como amplificadores o *enhancers* de la señal, consiguiendo una mejora en la especificidad de la señal de la reacción, no requiriendo análisis posterior alguno para identificar la muestra (Heid y col., 1996). En el mercado podemos encontrar termocicladores que disponen de varios canales y filtros para medir fluorescencia (**Figura I.14**), y numerosos fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda, pudiendo así diseñar sistemas múltiplex que permitan determinar, de forma simultánea, hasta cuatro trazadores

(cada fluoróforo debe emitir fluorescencia a una longitud de onda), en la misma mezcla de reacción.

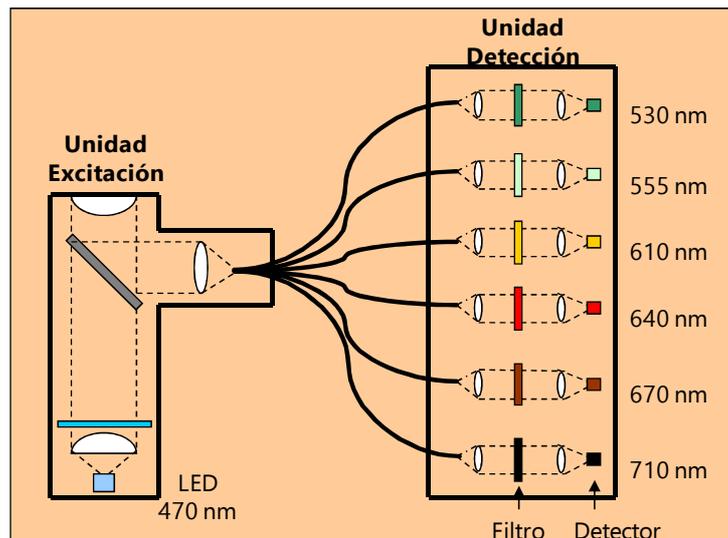


Figura I.14: Representación esquemática de las unidades excitación y detección de un termociclador comercial que dispone de seis canales.

Finalmente, el hecho de que el ciclo en el que se alcanza un nivel de fluorescencia determinado es inversamente proporcional al número de copias inicial de ADN molde en la reacción, permite realizar medidas cuantitativas (Higuchi y col., 1993).

La capacidad de la qPCR para aportar información *in situ* y en tiempo real sobre la composición de la materia prima o producto acabado, ha disparado sus aplicaciones en el sector agroalimentario, como por ejemplo en la identificación y cuantificación de material vegetal modificado genéticamente (OMG) en alimentos y piensos (Di Pinto y col., 2008; Hernández y col., 2003), microorganismos patógenos (Elizaquível y col., 2011), y numerosas especies en diferentes matrices: carnes, lácteos y derivados, peces o harinas y piensos destinados a la alimentación animal (Bansal y col., 2017).

Al igual que ocurría en la PCR en tiempo final, cada ciclo de la qPCR consta de una etapa de desnaturalización, una de hibridación de los cebadores y sondas

en este caso, y una última etapa de polimerización 5' → 3'. Como se ha comentado anteriormente, la cuantificación de las muestras diana se lleva a cabo en la fase exponencial (Heid y col., 1996), ya que teóricamente la eficiencia de la reacción es del 100%, y en esta fase, se duplica la cantidad de producto obtenido en cada ciclo de amplificación. Para realizar el seguimiento, en tiempo real, de la amplificación por PCR, podemos recurrir a varios sistemas basados en la emisión de fluorescencia: agentes intercalantes, sondas de hidrólisis, sondas de hibridación o sondas con estructura de horquilla (Wittwer y col., 1997a). Debemos tener en cuenta que la selección de la química de la sonda, va a influir en la sensibilidad de los ensayos de PCR, por lo que debe optimizarse con anterioridad (Josefsen y col., 2009). A continuación, se describen las sondas más utilizadas y disponibles en el mercado.

1.6.6. Agentes que se intercalan en la molécula de ADN

Se trata de sustancias que aumentan considerablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena pudiendo así hacer seguimiento del transcurso de la amplificación, siendo la fluorescencia proporcional a la concentración de ADN. Entre ellos, SYBR®Green (fluorocromo de la familia de las cianinas) es el más utilizado en PCR a tiempo real (Wittwer y col., 1997b).

El producto obtenido en cada ronda de amplificación puede visualizarse de forma continua, ya que la intensidad de la luz emitida es proporcional a la cantidad de complejo SYBR®Green-ADN en la solución (Wittwer y col., 1997a), apareciendo claramente a partir de un determinado número de ciclos, en función de la concentración de ADN en la muestra inicial (**Figura I.15**).

Al unirse a cualquier ADN de doble cadena no requiere etapas de diseño u optimización de las sondas marcadas, siendo por ello la opción más sencilla y económica para la puesta a punto de protocolos de PCR en tiempo real.

A pesar de las ventajas descritas, los agentes intercalantes no permiten discriminar entre productos de reacción específicos e inespecíficos (como los dímeros de oligonucleótidos), pudiendo dar falsos positivos, siendo la sensibilidad el principal hándicap de este sistema, limitando así el empleo de SYBR®Green (Wittwer y col., 1997a).

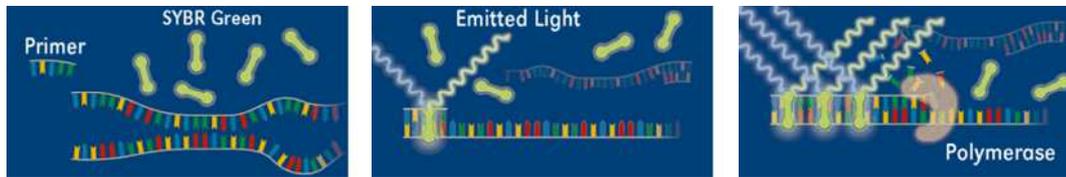


Figura I.15: Amplificación mediante SYBR®Green. El colorante se une al surco menor del ADN de doble cadena, no al ADN monocatenario, dando lugar a un incremento de la señal fluorescencia (color verde). Tras cada ciclo del PCR (ADN recién sintetizado), la emisión de fluorescencia aumenta proporcionalmente al número de moléculas del ADN de doble cadena presentes en el tubo de reacción.

Así, la mayoría de los protocolos que utilizan esta aproximación requieren además la confirmación de los resultados obtenidos por fluorescencia, mediante el análisis de los productos de PCR por electroforesis. Se han aplicado otras aproximaciones que pueden ser más recomendables que la electroforesis, evitando así operaciones manuales post-amplificación. Diferentes trabajos que aparecen en la bibliografía apoyan el empleo de las curvas de fusión de los productos de PCR ya que SYBR®Green permite distinguir las señales obtenidas a partir de diferentes productos de PCR, pudiendo diferenciar unos fragmentos de otros evaluando las respectivas temperaturas de fusión (T_m = temperatura a la cual el 50% de la molécula de ADN está desnaturalizada). Al llegar a T_m , las dos cadenas empiezan a separarse, provocando la salida del colorante y en consecuencia, el descenso de la fluorescencia, que puede cuantificarse y asociarla a cada producto de reacción (Ririe y col., 1997). Ello permitirá asegurar la identificación correcta del producto amplificado que ha sido detectado (Hernández y col., 2003).

En la bibliografía encontramos protocolos basados en reacciones de PCR múltiples para la detección de dos o más especies (Trotta y col., 2005) o material transgénico (Hernández y col., 2003) en la misma reacción de amplificación. Al existir una correlación entre la altura del pico de la curva de fusión del amplicón (o el área bajo el pico) y el número de copias de ADN molde en la reacción, se

podría determinar la proporción de ADN de cada especie en la mezcla (Wilhelm y col., 2003).

1.6.7. Sondas de hidrólisis

Se fundamentan en el fenómeno de transferencia de energía de fluorescencia por resonancia, abreviado como FRET (Clegg, 1995). Las más utilizadas en los métodos de PCR entiendo real descritos son las TaqMan® (Holland y col., 1991), que se basa en la actividad 5'→3' de la enzima Taq ADN polimerasa y en la utilización de una sonda doblemente marcada con un fluoróforo donador, que es excitado por una fuente de luz externa, emitiendo luz que absorbe un segundo fluoróforo próximo a él, denominado aceptor.

Habitualmente las sondas son secuencias cortas de oligonucleótidos, marcadas con una molécula fluorescente en 5' y otra molécula apantalladora de fluorescencia en su extremo 3', cuyos espectros de excitación y emisión se solapan, por lo que cuando se encuentran relativamente próximas tiene lugar la extinción de fluorescencia (o *quenching*) por FRET.

Así, cuando la sonda está intacta no hay emisión de fluorescencia; en cambio, cuando hibrida con su ADN molde complementario y es hidrolizado por la actividad exonucleásica 5'→3' de la enzima Taq polimerasa, rompe la sonda en su avance para generar el producto de amplificación, separando suficientemente ambos marcadores para poder detectar la fluorescencia emitida (**Figura I.16**), que será proporcional a la cantidad de producto amplificado (Heid y col., 1996).

Para que las sondas TaqMan® funcionen adecuadamente en el proceso de PCR en tiempo real, su T_m , debe ser 10 °C superior a la de los cebadores. Esta salvedad requiere el diseño de sondas con un tamaño próximo a 27 nucleótidos, hecho que puede dificultar la selección de regiones de ADN conservadas que cumplan simultáneamente los requisitos para los cebadores y la sonda y se encuentren adecuadamente espaciados para poder discriminar entre grupos de especies. Una posible solución a los inconvenientes descritos se centra en el empleo de sondas MGB (*minor groove binding*, en versión anglosajona), se trata de oligonucleótidos con forma de media luna, modificados por la unión de moléculas, que mejoran la afinidad por el surco menor del ADN de doble cadena.

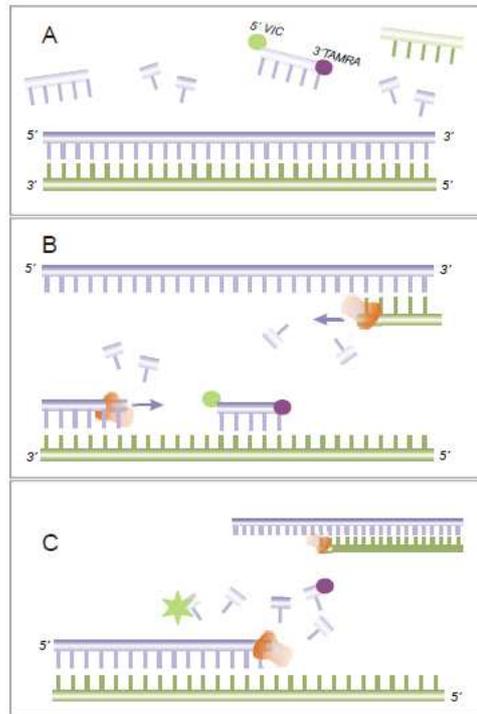


Figura I.16: Comportamiento de las sondas de hidrólisis tipo TaqMan® en la PCR en tiempo real. **A.** La reacción inicial contiene los cebadores, nucleótidos y la sonda marcada en 5' con un fluorocromo reporter (VIC) y un amortiguador de fluorescencia quencher en 3' con (TAMRA). **B.** La sonda y los cebadores se unen al ADN diana iniciando la síntesis de la nueva cadena. **C.** La actividad 5'→3' exonucleasa de la enzima Taq polimerasa hidroliza la sonda (la rompe), en su avance para completar el producto de amplificación. Al separarse los fluoróforos, se observa la fluorescencia emitida. Así, el número de moléculas que emiten fluorescencia aumenta proporcionalmente a la cantidad de ADN amplificado, mayor a mayor número de ciclos.

En las sondas Taqman®, el grupo MGB va unido habitualmente al extremo 3', junto al "quencher". Al hibridar la sonda, MGB estabiliza la unión pegándose al surco menor de la doble cadena de ADN generada entre la sonda y la secuencia diana, permitiendo reducir el tamaño de la sonda hasta tamaños de 13 a 16 nucleótidos (Afonina y col., 1997), la mitad que una sonda estándar.

Actualmente, se está incorporando a estas sondas un quencher oscuro (no fluorescente, NFQ), emitiendo una señal más limpia y con menos fluorescencia de fondo (ruido) procedente de la reacción, mejorando así la discriminación y facilitando la interpretación de los datos.

1.7. CUANTIFICACIÓN

En la PCR convencional se observa el resultado final de la amplificación (Fase Plateau), cuando se agotan los reactivos, mientras que en la PCR en tiempo real se analizan los datos de la fase de crecimiento exponencial, siendo el incremento de fluorescencia de la sonda, directamente proporcional al número de amplicones generados, mejorando la precisión, resolución y sensibilidad.

Para realizar la cuantificación se compara el ciclo C_T (ciclo umbral o *threshold cycle*, en versión anglosajona) al que la muestra desconocida alcanza el mismo nivel de fluorescencia que la muestra patrón, de la que conocemos su concentración inicial o número de copias de ADN. Teniendo en cuenta que en la fase exponencial se duplica el número de moléculas en cada ciclo de PCR, y por tanto la fluorescencia, el valor C_T deberá ser proporcional al número de copias de ADN inicial en la muestra.

En la (**Figura I.17**) se representa el aumento de fluorescencia en un proceso de PCR en tiempo real, así como la relación entre los valores de C_T de dos muestras que contienen inicialmente diferente número de copias de ADN diana. Cuando se llega al nivel de fluorescencia de referencia (N_{CT}), el número de copias de ADN será proporcional al número de copias inicial (N_i), según la ecuación:

$$N_{CT} = N_i \times 2^{CT}$$

Podemos representar linealmente los datos aplicando logaritmos a la ecuación anterior (Higuchi y col., 1993):

$$\log N_{CT} - \log N_i = C_T \times \log 2$$

Despejando ahora C_T de la ecuación anterior, obtenemos:

$$C_T = -\left(\frac{1}{\log 2}\right) \log N_i + \left(\frac{\log N_{CT}}{\log 2}\right)$$

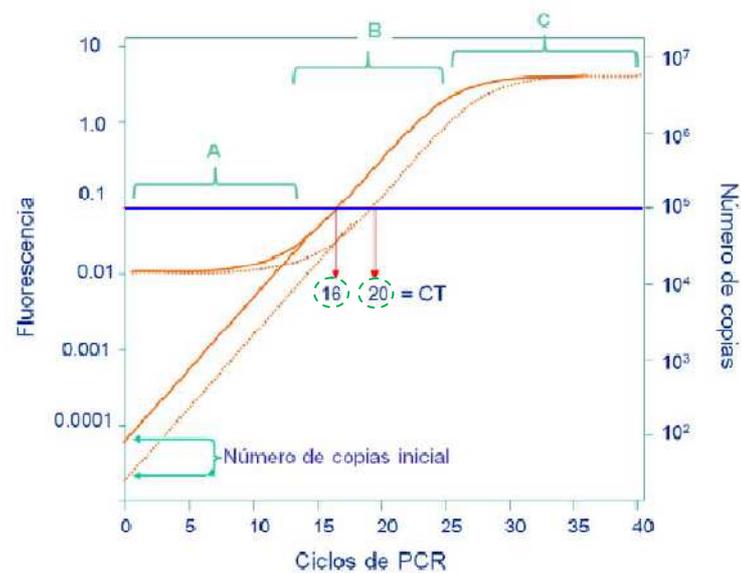


Figura I.17: Representación esquemática de las diferentes etapas en la detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real. En A sólo se detecta la fluorescencia de fondo (ruido). En los ciclos enmarcados en B, se observa un incremento de fluorescencia exponencial, pudiendo realizar medidas cualitativas y/o cuantitativas. En C la reacción llega a la fase Plateau, donde se agotan los reactivos, por lo que la señal de fluorescencia se iguala, independientemente de la cantidad de ADN de partida y la medida sólo es relevante como dato cualitativo (tiempo final). Para cuantificar el ADN en dos muestras (líneas naranjas), se establece un nivel de fluorescencia de referencia (línea azul). El C_T de cada muestra corresponde al ciclo donde la respectiva fluorescencia corta (alcanza) el nivel de referencia (16 para una y 20 para la otra), y será proporcional al número de copias iniciales de ADN en la reacción.

Así, al representar cada valor de C_T que corresponde a una determinada cantidad inicial de ADN (N_i), se obtendrá una recta de calibrado cuya pendiente será:

$$\left[-\left(\frac{1}{\log 2}\right)\right]$$

y la ordenada en el origen (corte con el eje C_T), vendrá determinada por:

$$\left(\frac{\log N_{CT}}{\log 2}\right)$$

Experimentalmente se ha comprobado que la cantidad de ADN producida en cada ciclo puede no coincidir exactamente con lo esperado teóricamente (el doble de la que había en el ciclo inmediatamente anterior), lo que conduce a formular la siguiente ecuación:

$$C_T = -\left(\frac{1}{\log E}\right) \log N_i + \left(\frac{\log N_{CT}}{\log E}\right)$$

Donde E es la eficiencia de la reacción de PCR, es decir, el número de copias de producto de reacción (en valor medio) por cada ciclo de PCR.

Las eficiencias del PCR en tiempo real pueden obtenerse experimentalmente a partir del valor de pendiente al representar C_T frente al logaritmo de la concentración inicial de ADN (N_i), haciendo diluciones seriadas que contendrán diferentes cantidades del mismo ADN diana. La eficiencia de PCR se calcula a partir de la siguiente expresión: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$; y es un parámetro importante en los métodos cuantitativos ya que permite realizar comparaciones entre los datos obtenidos a partir de distintos amplicones.

A la hora de seleccionar un método de cuantificación (absoluto o relativo), debemos tener en cuenta la secuencia diana a amplificar, la cantidad de ADN presente en la muestra de partida y el grado de exactitud requerido.

1.7.1. Cuantificación absoluta

Si optamos por esta forma de cuantificar, tendremos una valoración de la cantidad de ADN diana presente en la muestra problema, requiriendo construir una curva de calibrado con ADN de referencia, cuantificado previamente por un método independiente (*ver sección 1.6.2*), pudiendo así relacionar el número de copias fijo de la curva estándar con la señal obtenida para cada muestra problema. A pesar de que en algunos procedimientos de PCR en tiempo real se da como resultado de cuantificación absoluta un valor obtenido en unidades de masa de ADN, sólo va a ser posible cuantificar el número de copias de ADN diana presente al inicio de la reacción si trabajamos de forma rigurosa atendiendo a las prestaciones de la metodología, debiendo expresar el resultado de la cuantificación absoluta en número de copias del ADN diana (Morrison y col., 1998). Al igual que cualquier otra metodología analítica, esta forma de cuantificar presenta el inconveniente de que valora el número de copias de ADN diana en la muestra y no la cantidad de material presente, ya que el contenido en ADN por unidad de masa puede variar en función de la naturaleza y procedencia del material utilizado en la extracción (tejidos, órganos etc.), ya que la cantidad de ADN es variable, requiriendo además el empleo de un método independiente para determinar en la muestra patrón, el número de copias de ADN diana por unidad de masa para obtener la recta de calibrado, etapa que presenta cierta dificultad, pues requiere conocer con precisión el tamaño de la molécula de ADN. Habitualmente se requiere construir plásmidos que contienen el fragmento de ADN a detectar clonado, para disponer así de un dato más fiable para determinar el peso molecular, suponiendo un coste añadido para la realización de este tipo de ensayos.

Para trabajar con propiedad con las curvas de calibrado, es preciso evaluar que las eficiencias del ADN de la muestra y la del ADN estándar son similares (Ferre, 1992; Souaze y col., 1996). Así, en la cuantificación de ADN por PCR en tiempo real habrá que prestar especial atención al diseño y preparación de las curvas estándar, con énfasis en la determinación exacta de las concentraciones de los estándares, su estabilidad y almacenamiento a largo plazo; ya que son factores que afectan a la calidad (exactitud y precisión), de los resultados generados (Pfaffl, 2008). Así, se ha evidenciado una variación de los números de copias de

los estándares durante el almacenamiento (de 0 a 14 días), siendo más estables las secuencias clonadas que los productos de PCR, por lo que es aconsejable analizar rutinariamente los estándares a emplear en el ensayo, ya que de no hacerlo podríamos tener resultados erróneos (Dhanasekaran y col., 2010).

Habitualmente, la cuantificación absoluta se utiliza en determinaciones donde se requiere conocer el número de copias de ADN diana, como por ejemplo la cantidad de ciertos microorganismos (virus o bacterias) o en la identificación y cuantificación de OMGs en alimentos y piensos (Cattori y Hofmann-Lehmann, 2008; Mazur y col., 2017), expresando el resultado en porcentaje de material problema con respecto al conjunto que constituye la muestra a analizar. En el caso de OMGs los resultados se expresan como porcentaje de material modificado (construcción específica) frente al no modificado (gen de referencia), de la misma especie (EU, 2004), requiriendo la elaboración de dos rectas de calibrado a partir de materiales de referencia, una para el transgén y otra para un gen endógeno de la misma especie (habitualmente maíz y soja), con cantidades de ADN en número de copias, conocidas.

Si conocemos el número de copias por genoma del transgén en el evento, podemos conocer la relación de material transgénico frente al no transgénico en la muestra, extrapolando en la recta de calibrado los valores de C_T para ambos detectores obtenidos con la muestra problema. En principio, la estrategia seguida se podría aplicar a la cuantificación de especies, sin embargo, necesitaríamos disponer de ADN de distintas especies, dificultando el empleo de genes endógenos que podamos utilizar como referencia, al contrario de lo que ocurría en el caso de los transgénicos. A pesar de que no se ha llegado a un consenso respecto a la expresión de los resultados cuando se comparan distintas especies, una aproximación adecuada consiste en determinar el porcentaje de la especie analizada en la muestra, refiriendo la cantidad de ADN de la especie analizada a la cantidad de ADN total utilizada en la reacción. En ciertas ocasiones se han utilizado otras técnicas, como la espectrometría UV-*vis* para determinar la concentración de ADN total (Walker y col., 2003; Walker y col., 2004; Zhang y col., 2007a,b). Sin embargo, para obtener medidas más precisas y fiables se requiere una referencia interna, similar a la utilizada en cuantificación de transgénicos.

Este ADN de referencia puede cuantificarse mediante detectores que amplifican grupos amplios de especies como mamíferos, para sistemas específicos de detección de cerdo (Rodríguez y col., 2005), o ternera (Brodmann y Moor, 2003). Como alternativa al empleo como referencia interna de ADN se ha propuesto el empleo de matrices estandarizadas, como salchichas o albóndigas con distintos porcentajes de carne de diferentes especies, y elaborar rectas de calibrado a partir del ADN obtenido de estas matrices, en lugar de utilizar diluciones seriadas de un ADN de referencia.

De esta forma, los C_T obtenidos de la muestra problema se pueden extrapolar directamente sobre las rectas, obteniéndose directamente la proporción de material cárnico de cada especie en la muestra. A pesar de que el método se ha aplicado con éxito en ensayos interlaboratorio (Eugster y col., 2009; Köppel y col., 2008), requiere disponer de las matrices adecuadas para cada tipo de ensayo.

1.7.2. Cuantificación relativa

En esta aproximación se compara la cantidad de ADN presente en una muestra problema con respecto a la cantidad de otro ADN que se utiliza como referencia (Raeymaekers, 1993), sin necesidad de conocer las cantidades absolutas o las concentraciones de los ADNs que se analizan.

En este caso, las rectas de calibrado se emplean para establecer las eficiencias de amplificación de los dos detectores que se comparan, pero no para extrapolar las cantidades de ADN en la muestra. El uso de la cuantificación relativa se ha extendido habitualmente en ensayos de expresión génica, aplicaciones que utilizan genes constitutivos para la normalización de las medidas realizadas (She y col., 2009). Al codificar proteínas esenciales para el funcionamiento de las células, la expresión de estos genes es menos variable que la de otros, considerándose por ello constante en las condiciones de ensayo (Thellin y col., 1999). Habitualmente, la relación (R) de la expresión de un gen (X) en dos condiciones (A y B), se obtiene mediante la expresión:

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

donde ($\Delta\Delta C_T$) es la representación simplificada de de:

$$(C_{T\text{referencia condición A}} - C_{T\text{gen X condición A}}) - (C_{T\text{referencia condición B}} - C_{T\text{gen X condición B}}).$$

Así, se podría utilizar una aproximación similar para determinar el contenido de las diferentes especies presentes en muestras de alimentos cuantificando el ADN; diseñando un detector específico para cada especie diana, que consistirá en los siguientes elementos: una pareja de cebadores (directo e inverso o *forward* y *reverse*, en versión anglosajona), y la sonda fluorescente, diseñando además un tercer detector que sea común a ambas especies y que se utilizará como referencia.

Si es similar la eficiencia de reacción de los tres detectores, podemos obtener un valor de (ΔC_T) = [$C_{T\text{especie}} - C_{T\text{referencia}}$] para cada especie, determinando el porcentaje (%) de la especie diana aplicando la siguiente expresión:

$$(\%) = 2^{-C_T} \times 100$$

Esta aproximación se ha utilizado con buenos resultados (López y Pardo, 2005), para la cuantificación de especies de atún en conservas comerciales.

Para llevar a cabo determinaciones del tipo presencia/ausencia, se utilizan con frecuencia elementos de la cuantificación absoluta y relativa para obtener datos semi-cuantitativos, pudiendo establecer si el contenido de una especie en la muestra supera o no un determinado umbral en cantidad o porcentaje. Los resultados se expresarán finalmente como positivo o negativo, junto con un valor que especifica el límite de detección de la metodología.

Por ejemplo, si el límite de detección del método se establece en el 5%, toda muestra que contenga un porcentaje de la especie analizada inferior al 5% será considerada negativa, siendo positivas todas aquellas que superen ese valor. La versatilidad de la metodología de qPCR permite que la adaptación a estos requerimientos sea sencilla, a través de la determinación de la fluorescencia en la fase exponencial o bien, a tiempo final.

La etapa de validación se lleva a cabo con muestras que contienen la especie a analizar en la proximidad del umbral de detección, estableciendo unos valores de (ΔC_T) que permitan diferenciar entre las dos situaciones, teniendo en cuenta la incertidumbre asociada a la metodología.

Esta aproximación se utiliza de forma rutinaria en la detección de eventos transgénicos que superan el 0,9% en alimentos, tal y como es preceptivo en la UE. También se ha aplicado con éxito una metodología similar para la detección de las especies cárnicas más importantes, que presenta un umbral de detección del 0,5% total (Dooley y col., 2004).

II - OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

En los últimos años se observa un interés creciente por determinar el origen y contenido de los productos destinados al consumo, con especial énfasis en las especies animales y vegetales declaradas, y la composición de las presentes en productos elaborados. Las fuertes crisis alimentarias sufridas por la sociedad europea originadas por enfermedades transmitidas por alimentos han hecho que todos los sistemas de seguridad y salud existentes fueran puestos en duda, con repercusiones sin precedentes en todos los sectores, que exigen a las autoridades garantías en cuanto a la calidad, seguridad y veracidad del etiquetado.

Con el fin de asegurar la inocuidad y autenticidad a lo largo de toda la cadena alimentaria y proteger la salud del consumidor, las autoridades de los diferentes países han implantado programas de vigilancia y control cada vez más rigurosos, que requieren el desarrollo de metodologías analíticas más eficaces que permitan la detección y cuantificación de especies en todo tipo de productos destinados a la alimentación humana y animal.

Pero para llevar a cabo un riguroso control se requieren métodos sensibles, selectivos, rápidos, automatizables, económicos y fáciles de usar. Todo ello ha generado la necesidad de desarrollar métodos alternativos a los existentes, principalmente de *screening*, para la identificación de las especies presentes en alimentos, como ingredientes o bien formando parte del producto acabado (aditivos). El interés de estos métodos analíticos es doble. Primero, por la posibilidad de reducir los costes de los programas de vigilancia, y segundo, por la necesidad de conocer las fuentes, distribución, destino y efectos de los componentes añadidos fraudulentamente a los alimentos, que pueden ser perjudiciales para la salud e incluso el medioambiente.

Actualmente se plantean dos estrategias para la identificación y cuantificación de especies en alimentos: detección de proteínas y/o secuencias de ADN específicas de especie, presentando esta última ciertas ventajas frente a los métodos basados en proteínas. Entre las metodologías génicas, una de las opciones más versátiles se centra en la aplicación de la reacción en cadena de la

polimerasa a tiempo final para la identificación de ADN (*screening*) y a tiempo real (qPCR), para determinar y cuantificar el ADN presente en muestras complejas. De las diferentes variantes metodológicas de la qPCR destacan los sistemas basados en el empleo de sondas fluorescentes específicas. Desde hace algunos años se emplea una variante de las sondas fluorescentes de hidrólisis habituales, que presenta mayor afinidad por el surco menor del ADN (MGB) para determinaciones de polimorfismos en aplicaciones biomédicas, que pueden ser de aplicación en la identificación y cuantificación de especies en alimentos, permitiendo amplificar incluso en alimentos procesados, moléculas de ADN muy fragmentado, y detectar al mismo tiempo variaciones entre especies filogenéticamente próximas y entre variedades dentro de una misma especie, mediante el análisis de polimorfismos de un único nucleótido.

Con las premisas descritas, se han planteado los siguientes objetivos:

1- Desarrollar y determinar los límites operacionales de un método basado en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con sondas TaqMan® (MGB), específicas de grupos taxonómicos amplios (aves y mamíferos), combinadas con cebadores específicos de especie cuya diana es una secuencia mitocondrial, para identificación y cuantificación de especies.

2- Evaluar el sistema utilizando ADN de diferentes matrices: mezclas de ADN de dos especies frescas y procesadas de músculo y tejido.

3- Estudiar el efecto que tiene la degradación de las muestras en la cuantificación del método mediante la relación de amplificación de amplicones, con objeto de validar los datos obtenidos de los análisis cuantitativos.

4- Evaluar el uso de materiales de referencia adaptados a la matriz en alimentos, para aumentar la calidad de los datos cualitativos y cuantitativos derivados de los métodos de PCR de *screening* y en tiempo real.

5- Comparar los límites operacionales del sistema propuesto con sondas TaqMan® MGB específicas con otros métodos disponibles, en concreto con sistemas inmunoquímicos comerciales basados en la detección de proteínas, y valorar las ventajas y posibles aplicaciones de unos y otros.

6- Evaluar la aplicación de la tecnología TaqMan® MGB para la detección y cuantificación de ADN en alimentos de especies vegetales filogenéticamente próximas.

7. Validar un método de PCR para la detección de las secuencias P35S y T-NOS en alimentos y piensos, procedentes de OMG.

III - MATERIALES Y MÉTODOS

III – MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención del objetivo general y los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral, las tareas de investigación fueron diseñadas en tres experiencias que se describen a continuación.

Experiencia 1. Detección y cuantificación de especies cárnicas en alimentos procesados mediante qPCR.

Experiencia 2. Detección de mandarina en zumo de naranja mediante qPCR multiplex.

Experiencia 3. Detección cualitativa de material vegetal transgénico (P-35S y T-NOS) mediante PCR en alimentos susceptibles de contener material vegetal.

3.1. EXPERIENCIA 1. DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES CÁRNICAS EN ALIMENTOS PROCESADOS MEDIANTE QPCR

Para este estudio, se procedió en primer lugar al desarrollo de una batería de sistemas de detección para mamíferos y aves de uso generalizado en la industria alimentaria, como son bovino (*Bos taurus*), porcino (*Sus scrofa*), pollo (*Gallus gallus*) y pavo (*Meleagris gallopavo*), mediante la búsqueda de secuencias conservadas en grupos amplios de organismos (eucariotas, vertebrados, invertebrados, hongos, plantas, bacterias) para diseñar sondas y cebadores universales utilizables como control positivo de la presencia de ADN amplificable en las extracciones.

Una vez obtenidas las muestras puras de carne, se evaluaron diferentes protocolos de extracción de ADN, comerciales o no, para seleccionar aquel que condujera a los mejores resultados para la amplificación de secuencias por PCR.

Tras ello, se realizaron ensayos sobre muestras homogéneas (sin mezcla de ADN de diferentes especies), para determinar la viabilidad de los amplicones (sonda + cebador) seleccionados.

Por último, se llevaron a cabo ensayos de detección y cuantificación mediante PCR en tiempo real con los detectores seleccionados sobre mezclas de muestras de carnes frescas y sometidas a un procesado térmico, para determinar las prestaciones de la metodología propuesta sensibilidad, exactitud y reproducibilidad, comparando los resultados con los obtenidos por métodos inmunoquímicos.

A continuación se describen los materiales y métodos utilizados en esta experiencia.

3.1.1. Muestras de carne

Se obtuvieron muestras de carne fresca (tejido muscular) de ternera, cerdo, pollo y pavo de una carnicería, realizando el corte con diferentes cuchillos, limpiando exhaustivamente la zona de corte previo a la siguiente tanda. Las muestras se introdujeron por separado en bolsas transparentes, rotulándolas y sellándolas, y se almacenaron congeladas a -20 °C hasta su uso. Partiendo de las muestras puras, se prepararon mezclas binarias de carnes (ternera y cerdo) y

(pavo y pollo), combinando cantidades apropiadas de carne picada y magra para obtener las proporciones que se describen en la **Tabla III.1**.

Tabla III.1. Cantidades de carne de cada especie objeto de análisis en las mezclas

Muestra	Porcentaje			
	Tenera	Cerdo	Pollo	Pavo
1	100	0	0	0
2		100		
3			100	
4				100
5	0,1	99,9	0	0
6	1	99		
7	5	95		
8	25	75		
9	50	50		
10	99,9	0,1		
11	99	1		
12	95	5		
13	75	25		
14	50	50		
15			0,1	99,9
16			1	99
17			5	95
18			25	75
19			50	50
20			99,9	0,1
21			99	1
22			95	5
23			75	25
24			50	50
25	25	25	25	25

Las mezclas se introdujeron en bolsas. Se prepararon dos series de bolitas (albóndigas) de 100 g de carne de cada mezcla: **T** (cocida y esterilizada) y **F** (control no cocido). Las muestras de la serie **T** fueron sometidas a tratamiento térmico utilizando la línea de fabricación de la Empresa Lozano S.A (Molina de Segura, Murcia); fríendolas en aceite vegetal a 65 °C durante 15 minutos, tras añadir líquido de gobierno que contiene como ingredientes: concentrado de

tomate, almidón modificado de maíz, cebolla, margarina, pimienta molida blanca, ajo en polvo y sal; fueron enlatadas en botes barnizados de 1/2 kg y esterilizadas a 121 °C durante 30 minutos. Las muestras canicas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su uso. Las series F (control no tratadas), no fueron cocidas ni esterilizadas, y se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su uso.

3.1.2. Extracción de ADN

Las muestras de las series T y F se liofilizaron y se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino. El ADN se purificó a partir de 30 mg de carne, utilizando un kit de purificación de ADN Puregene® de Quiagen (Madrid, España) o el kit NucPrep® DNA de Applied Biosystems (Madrid, España). Las extracciones de ADN se realizaron en el equipo PrepStation 6100 de Applied Biosystems (Madrid, España), siguiendo los protocolos descritos en los respectivos kits para muestras de tejidos sólidos. La concentración de ADN en los extractos se determinó mediante fluorescencia, utilizando el espectrofotómetro Perkin-Elmer LS-50B, tras tinción con el fluoróforo comercial Picogreen dsDNA (Molecular Probes), comparando la fluorescencia con la de los patrones de ADN de concentración conocida. La concentración de ADN para obtener las curvas de calibrado mediante qPCR y las digestiones de ADN, se purificaron a partir de muestras de carne, previamente autenticadas mediante secuenciación de ADN de la región mitocondrial ND5-*cytB* (López-Andreo y col., 2005).

3.1.3. PCR en tiempo real

La detección y cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante amplificación, utilizando el equipo 7000 de detección de secuencias en tiempo real de Applied Biosystems (Madrid, España). Todas las reacciones se hicieron por duplicado en placas de 96 pocillos de Applied Biosystems (Madrid, España). El conjunto de cebadores y sondas diseñados frente al ADN mitocondrial, utilizados en esta experiencia, se resumen en la **Tabla III.2**.

Se evaluaron las posibles combinaciones de la sonda S1 con los respectivos cebadores (directo e inverso) FBOS3/RBOS1, FBOS3/RBOS2, FBOS3/ BOS3 para ternera y FC1SUS/RSUS2 para cerdo, para seleccionar los detectores específicos

BOS1 (92 pb), BOS2 (204 pb), BOS3 (319 pb) y SUS (100 pb); procediendo del mismo modo con la sonda S7 para las combinaciones FA1/RA1 y FA5/RA1 para pollo y pavo, respectivamente.

Tabla III.2. Cebadores y sondas oligonucleotídicas

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	ADN Diana
<i>Cebadores directos</i>		
FBOS3	CAAGAACACTAATGACTAACATTCGAAAG	Gen <i>t-Glu</i> bovino
FC1SUS	GAAAAATCATCGTTGTACTTCAACTACA	Gen <i>t-Glu</i> porcino
FA1	TCGCCCTCACAATCCTTACAA	Gen <i>ND5</i> de pollo
FA5	GGCTTGATCAAACCATATCTAGGATCT	Gen <i>ND5</i> de pavo
<i>Cebadores inversos</i>		
RBOS1	AAATGTTTGATGGGGCTGGA	Gen <i>cytB</i> bovino
RBOS2	AATGCTGTTGTTGTGTCGGA	
RBOS3	CCTCGTCCTACGTGCATATATAA	
RSUS2	GGTCAATGAATGCGTTGTTGAT	Gen <i>cytB</i> porcino
RA1	CTGGGAGGTCGATTAGGGAGT	Gen <i>cytB</i> de pollo y pavo
<i>Sondas TaqMan MGB</i>		
S1(FAM)	CCACCCACTAATAAA	Secuencia <i>cytB</i> de vaca y cerdo
S7(FAM)	TAATGGCACCCAACATT	Secuencia <i>cytB</i> de pollo y pavo

Las reacciones se realizaron por duplicado en placa -96 pocillos-, con un volumen de reacción de 25 µL, de los cuales 12,5 µL corresponden a la Máster Mix, TaqMan® 2x, (que incluye la enzima AmpliTaq Gold™ que se activa por calor). Las concentraciones finales de los cebadores específicos se ajustaron a 300 nM, la sonda MGB a 200 nM, y finalmente se adicionaron 2 µL de cada uno de los extractos conteniendo el ADN de las muestras (de 1 pg µL⁻¹ a 30 ng µL⁻¹). En cada experimento de RT-PCR, se incluyó una recta de calibrado a partir de diluciones seriadas (1:10) de las muestras puras de cada una de las especies. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 10 min a 95 °C para la activación de la enzima polimerasa seguido de 50 ciclos de desnaturalización (15 s a 95 °C) y anillamiento

(1 min a 55 °C). El equipo tomó medidas del incremento de fluorescencia en cada ciclo y el umbral del análisis se fijó en la zona media exponencial. El umbral de fluorescencia (C_T), se fijó en el mismo nivel exponencial medio para todos los ensayos. En los ensayos de amplificación de mezclas de carnes, los ensayos se realizaron por triplicado, incluyendo reacciones control de ADN no diana para cada detector, utilizando 4 ng de ADN de vaca (o cerdo), pollo (o pavo).

3.1.4. Cuantificación de especies cárnicas

Para cuantificar la proporción de carnes objeto de posible sustitución fraudulenta, presencia cerdo en la carne de ternera o bien de pollo en la de pavo, partiendo de las mezclas binarias realizadas (ver **Tabla III.1**), se obtuvieron las respectivas curvas estándar representando los valores de C_T vs. log de ADN, a partir de diluciones seriadas de ADN puro obtenido para cada especie y los detectores BOS1 y SUS (ternera/cerdo) o FA1/FA5 (pollo/pavo), determinando los respectivos valores de pendiente (**m**) y ordenada en el origen (**b**). Se hicieron duplicados de cada muestra, utilizando tres réplicas conteniendo 2 ng μL^{-1} de ADN, en las respectivas reacciones de amplificación de las mezclas binarias de las series F y T. El valor medio de C_T obtenido con el detector BOS1 se interpoló en la correspondiente curva estándar, para determinar la cantidad de ADN de ternera en la muestra (N_{BOS}).

El valor de C_T obtenido con el detector SUS no se interpoló directamente en la curva estándar, sino que se utilizaron las mezclas de carne de ternera/cerdo (50:50), como matriz de referencia para calibrar las diferencias en el contenido de ADN para las mismas cantidades de ternera y cerdo. Para estimar esta posible diferencia, se utilizó el parámetro D, que se definió como el número de ciclos que se necesita añadir al valor de C_T para SUS obtenido experimentalmente interpolado en las curvas estándar correspondientes, para obtener la misma cantidad de ADN detectada por BOS1 en la mezcla 50:50. Así, si las curvas estándar se definen por la expresión $C_T = m \log N + b$ (Higuchi y col., 1993), el parámetro D, puede determinarse mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{C_{Tb50} - b_{\text{ternera}}}{m_{\text{ternera}}} = \frac{C_{Tp50} - b_{\text{cerdo}} + D}{m_{\text{cerdo}}}; \quad D = \left(\frac{C_{Tb50} - b_{\text{ternera}}}{m_{\text{ternera}}} \right) + b_{\text{cerdo}} - C_{Tp50}$$

donde C_{Tb50} and C_{Tp50} corresponden a los valores de C_T obtenidos con los detectores BOS1 y SUS, respectivamente, a partir de la matriz de referencia (mezcla de ternera/cerdo (50:50)). Utilizando esta aproximación, se calcularon los valores de D_F y D_T para muestras frescas (F) y procesadas (T) para determinar el porcentaje real de carne de cerdo en cada serie de muestras. Así, la cantidad ajustada de ADN de cerdo en cualquier muestra se puede obtener de la siguiente ecuación:

$$N_{CSUS} = 10 \frac{C_{Tp50} - b_{cerdo} + D}{m_{cerdo}}$$

Y el porcentaje de carne de cerdo en la muestra se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$P_{cerdo} = 100 \times \frac{N_{CSUS}}{(N_{BOS} + N_{CSUS})}$$

Para determinar las concentraciones reales en las mezclas de pavo y pollo se procedió del mismo modo, utilizando sus respectivos detectores.

3.1.5. Digestión de ADN

El ADN de timo de ternera (*calf thymus* DNA, 10 μg , Sigma-Aldrich) se sometió a un proceso de digestión con la enzima DNasa I (RNase free, 5KU a 1 U μL^{-1} , Epicentre Technologies), a concentraciones de la enzima en el rango 10^{-3} - 2×10^{-4} U μL^{-1} , durante 10 min a 37 °C; en 500 μL de solución tampón de digestión (50 mM Tris-HCl; pH=7,5), conteniendo MgCl_2 (10 mM) y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína de suero bovino (BSA). Todas las digestiones se hicieron por duplicado. La extensión de la reacción se paró añadiendo 25 μL de una disolución de EDTA 0,5 M a pH=8, incubando posteriormente a 100 °C durante 10 min. Tras ello, las muestras se sometieron a una extracción con fenol/cloroformo, precipitando el ADN añadiendo un volumen de 500 μL de 1,2-propanol.

El *pellet* de ADN se lavó tres veces con etanol (al 70%), resuspendiendo finalmente tras eliminar los residuos de disolvente con 20 μL de agua ultrapura estéril, refrigerando la solución de ADN obtenida a 4 °C. Para normalizar los resultados, se utilizó una muestra control sin enzima. El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%), utilizando un voltaje de 20 V y tampón TAE (Durviz, Valencia), al que se le adicionó bromuro de etidio para tener una concentración final de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sambrook y col., 1989). En todos los ensayos de amplificación por qPCR, se utilizó como control una muestra de 2 μL de una dilución del ADN sometido al proceso de digestión (20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$).

3.1.6. Detección de especies cárnicas por inmunoensayo

La identificación de especies cárnicas (ternera/cerdo) y (pavo/pollo) se llevó a cabo utilizando los kits ELISA comerciales adquiridos a la empresa BioKits para carnes frescas o procesadas, de Tepnel Biosystems Ltd. (Stamford, CT, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras correspondientes a la serie F y T fueron homogeneizadas en un Osterizer (Milwaukee, WI, USA), antes de someterlas al proceso de extracción, para el que se utilizaron porciones de 5 g de carne triturada. Las muestras correspondientes a cada serie se colocaron en tubos de teflón, adicionando 50 mL de una disolución de NaCl al 0,9%, agitando durante 30 s en un vortex, incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Tras ello, los extractos se diluyeron 1/10 (v/v) con tampón fosfato (PBS: 10 mM fosfato, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH=7,4) para eliminar interferencias de la matriz, utilizando 100 μL para el ensayo ELISA. Revelada la actividad de la enzima y detenido el desarrollo de color tras la adición de 100 μL de la disolución de parada, la densidad óptica fue medida a 450 nm y registrada utilizando un lector de placas marca Spectra MAX_{340pc} microplate reader de Molecular Devices (Toronto, Canada). Para el lavado de las placas se utilizó un lavador de microplacas Nunc Inmuno Wash 12 (Nunc MaxiSarp, Roskilde, Dinamarca). El procesamiento de los datos se llevó a cabo utilizando el paquete informático Sigmaplot 2.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Alemania).

3.2. EXPERIENCIA 2. DETECCIÓN DE MANDARINA EN ZUMO DE NARANJA MEDIANTE QPCR MULTIPLEX

Este trabajo de investigación se justifica por la necesidad que existe dentro de la industria agroalimentaria, de disponer de nuevos sistemas de análisis más sensibles y sencillos que los actuales, para la identificación y cuantificación de los componentes declarados en productos procesados. Así, se plantea el desarrollo de un método rápido y sencillo para la diferenciación de las principales variedades de naranja, mandarina, clementina y satsuma.

Para resolver el problema planteado inicialmente, detección de mandarina en zumo de naranja, deberíamos ser capaces de dar respuesta a las siguientes cuestiones:

- ¿Es posible detectar la presencia de mandarina en mezclas de mandarina/naranja a porcentajes iguales o inferiores al 5%?
- ¿Afecta el proceso de fabricación (uso de concentrados) a la detección?
- ¿Es posible cuantificar la cantidad de cada ingrediente por métodos genéticos?

Así, se establecieron los siguientes objetivos particulares, cuya resolución permitiría alcanzar con éxito el objetivo principal: detección de mandarina en zumo de naranja.

- Desarrollar un método de PCR para la detección de mandarina en zumos de naranja.
- El método debe ser válido para zumos y zumos procedentes de concentrado.
- Debe permitir cuantificar o distinguir entre mandarina añadida como ingrediente o bien, mandarina procedente de contaminación cruzada.

Para abordar los objetivos particulares planteados, se identificaron las siguientes tareas, a resolver por orden cronológico:

- En primer lugar, se deben identificar las diferencias genéticas entre mandarina y naranja, independientes de la variedad.
- Las diferencias encontradas, permitirán diseñar un sistema de primer y sondas y optimizar la PCR. El método de análisis a desarrollar será para uso en laboratorio y debe permitir obtener resultados en 1-2 días, preferiblemente en 1.
- Validación del método, realizando ensayos con diferentes muestras de partida para estimar la sensibilidad, reproducibilidad y precisión de los resultados.

A continuación se describen los materiales y métodos utilizados en esta experiencia.

3.2.1. Muestras de naranja y mandarina

Las muestras naranja y mandarina utilizadas en este trabajo fueron suministradas por el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Se utilizaron brotes jóvenes (hojas), de las siguientes variedades (**Tabla III.3**), procedentes de la finca experimental de la Alberca. Los zumos de naranja y mandarina se prepararon a partir de las variedades Valencia Late y Fortune, o bien partiendo de concentrados suministrados por la empresa JUVER SLU (Murcia, España).

Cuando el zumo se preparó a partir de concentrados (65% p/p), las muestras se reconstituyeron con agua hasta el 12% p/p. Los zumos de naranja con diferentes porcentajes de mandarina se prepararon adicionando los volúmenes correspondientes de zumo recién exprimido (serie NFC), o concentrados reconstituidos (serie FC). Los zumos de naranja comerciales se adquirieron en un supermercado local.

3.2.2. Extracción de ADN

Las hojas se cortaron en porciones de 5 mm² con un bisturí y se molieron posteriormente en un mortero hasta obtener una pasta. El ADN se extrajo utilizando un kit comercial UltraClean® Plant DNA Isolation Kit de MoBio

(Madrid, España), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El ADN purificado se resuspendió en 50 μ L de agua ultrapura estéril, determinando la concentración de ADN en los extractos mediante fluorescencia utilizando el espectrofotómetro Perkin-Elmer LS-50B, tras tinción con el fluoróforo comercial Picogreen dsDNA (Molecular Probes), comparando la fluorescencia con la de los patrones de ADN de concentración conocida.

Tabla III.3. Variedades de naranja y mandarina y código de la secuencia utilizada

Tejido foliar	N	Variedad	Código de secuencia
Naranjas	1	Newhall	_1NNEWH
	2	Navelate	_2NNAVEL
	3	W. Navel	_3NWNNAV
	4	Vernalina	_4NVERN
	5	Santomera	_5NSANT
	6	Sanguinelli	_6NSANG
	7	Valencia Late	_7NVLATE
	8	Lanelate	_8NLANEL
	9	Salustiana	_9NSALUS
Mandarinas	10	Okitsu	_10MOKIT
	11	Clauselina	_11MCLAU
	13	Orogrande	_13MOROG
	14	Marisol	_14MMANIS
	16	Arrufetina	_16MARRUF
	17	Clemenules	_17MCLEME
	18	Oronules	_18MORONU
	19	Hernandina	_19MHERNAN
	20	Nova	_20MNOVA
	21	Fortune	_21MFORTU
	23	Fedele	_23MFEDEL
	24	Tardino	_24MTARD
	25	Mandarina común sin semilla	_25MCOMUN

3.2.3. Secuenciación de ADN

Utilizando ADN obtenido de las hojas de todas las especies suministradas por el IMIDA, se llevó a cabo la secuenciación de la región intergénica trnL-trnF del ADN de cloroplasto (sección comprendida entre 50990–51720 pb), utilizando la base de datos de secuencias Genbank (entrada NC_008334) para identificar

posibles polimorfismos entre variedades. La secuenciación se llevó a cabo en el Servicio de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando un secuenciador de ADN modelo 3730 de Applied Biosystems. Se realizaron búsquedas de similitud de ADN utilizando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), en la base de datos pública NCBI.

Para la amplificación y secuenciación de los fragmentos de ADN de las diferentes variedades se utilizaron los siguientes juegos de cebadores:

LF2: 50 GCTTCTATCGAATATCGAAACTC	}
LR2: 50 CTTGAACCCTCACGATTTC	
LF3: 50 GAAATCGTGAGGGTTCAAGTC	}
LR3: 50 GATTTGAACTGGTGACACGAG	

3.2.4. Detección y cuantificación de ADN

La detección y cuantificación del ADN se llevó a cabo mediante amplificación, utilizando el equipo 7000 de detección de secuencias en tiempo real de Applied Biosystems (Madrid, España). Todas las reacciones se hicieron por duplicado en placas de 96 pocillos de Applied Biosystems (Madrid, España). En las reacciones de amplificación se utilizaron los siguientes cebadores:

CTR02F: 50 CTCTTATCACAAGCCGTATGGTCTATACGATATATGTAGA
CTR02R: 50 TATGAGCAATAATATGGATTGGGAATCATTAAAACG

Que hibridan con naranja y mandarina, diseñando sondas específicas para cada especie, marcadas con MGB:

Sin3FAM: (FAM)-50CTTTGAGCAAGGA-(TAMRA); para naranja
Ret2VIC: (VIC)-50CACCTTTGATCAAGGAATC-(TAMRA); para mandarina

Las reacciones se realizaron por duplicado en placa -96 pocillos-, con un volumen de reacción de 25 µL, de los cuales 12,5 µL corresponden a la Máster Mix, TaqMan® 2x, (que incluye la enzima AmpliTaq Gold™ que se activa por

calor). Las concentraciones finales de los cebadores específicos se ajustaron a 300 nM, la sonda TaqMan® MGB a 200 nM (Sin3FAM para naranja y Ret2VIC para mandarina), y 2 μL de ADN purificado. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 10 min a 95 °C para la activación de la enzima polimerasa seguido de 40 ciclos de desnaturalización (15 s a 95 °C) y anillamiento (1 min a 59 °C). El equipo tomó medidas del incremento de fluorescencia en cada ciclo, y el umbral del análisis se fijó en la zona media exponencial.

Las amplificaciones de las mezclas binarias de zumo se hicieron por duplicado, utilizando 2 ng μL^{-1} de ADN, y el valor medio de C_T obtenido con la sonda Sin3FAM ($C_{T\text{sin}}$), se interpoló en la correspondiente curva estándar, para determinar la cantidad de ADN de naranja (N_{sin}).

Para estimar esta posible diferencia, se utilizó el parámetro D , que se definió como el número de ciclos que se necesita restar al valor de C_T experimental obtenido con la sonda Ret2VIC ($C_{T\text{ret}}$) y interpolarlo en la curva estándar correspondiente, para obtener la misma cantidad de ADN de naranja que el detectado en una muestra que contiene el 50%. Así, la concentración ajustada de ADN de mandarina en cualquier muestra, puede determinarse mediante la siguiente ecuación:

$$N_{\text{ret}} = 10^{(C_{T\text{ret}} - b_{\text{ret}} - D) / m_{\text{ret}}}$$

donde b_{ret} y m_{ret} corresponden a los valores de C_T de la ordenada en el origen (\mathbf{b}) y la pendiente (\mathbf{m}) de la curva estándar de mandarina.

Y el porcentaje de ADN de mandarina en la muestra se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ mandarina} = 100 \times N_{\text{ret}} / (N_{\text{sin}} + N_{\text{ret}})$$

Para determinar el error experimental, se consideró el porcentaje de la diferencia entre la cantidad real de mandarina y la calculada mediante qPCR.

3.3. EXPERIENCIA 3. DETECCIÓN CUALITATIVA DE MATERIAL VEGETAL TRANSGÉNICO (P-35S Y T-NOS) MEDIANTE PCR EN ALIMENTOS SUSCEPTIBLES DE CONTENER MATERIAL VEGETAL

Este trabajo de investigación se justifica por la necesidad que existe dentro de la industria agroalimentaria y los laboratorios de control, de disponer de sistemas de análisis para la identificación de OMG en alimentos y piensos. En este sentido, debíamos ser capaces de desarrollar un método de *screening* basado en el empleo de PCR, para la identificación de las dos secuencias que modulan y permiten la correcta síntesis y expresión del transgén (promotor y terminador), ya que bien las dos, o al menos una de ellas, se encuentran en la mayor parte de los OMG desarrollados hasta el momento (>95%).

A continuación se describen los materiales y métodos utilizados en esta experiencia.

3.3.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en esta experiencia fueron adquiridos a las siguientes casas comerciales Applied Biosystems, BioRad, Sigma Aldrich, Durviz, Sistemas Genómicos y Tecnoquim: Cloroformo estabilizado con etanol (Calidad PA); Isopropanol (Calidad PA); Etanol 70% (Calidad PA); Agarosa (Grado biología molecular); Bromuro de Etidio (Grado biología molecular); Xilencianol (Grado biología molecular); NaOH 2N, se compra sólido (Calidad PRS) y se prepara disolviendo 0,8 g de NaOH en 10 mL de agua destilada. Se guardan en alícuotas de 2 mL en el congelador, (la fecha de caducidad es de un año); Tampón Tris-borato (TBE) 0,5X; Tampón de carga con azul de bromofenol; Tampón de carga con xilencianol; Agua ultrapura estéril; Kit ExtraGen-Alimentos; Kit AutentiGen-Alimentos; Marcador de peso molecular 100pb; Azul de Bromofenol (Calidad PA); Trizma Base (tris hidroximetilaminometano), grado biología molecular; Ácido bórico. Grado biología molecular; EDTA (ácido etilendiaminotetracético sal sódica 2-hidrato) calidad PA; Glicerol (Calidad PA); Guantes de plástico, latex y vinilo sin talco; Puntas con filtro; Tubos estériles de 50 mL (Tipo Falcon); Bolsas autocierre para guardar las muestras homogeneizadas; Parafilm; Tubos estériles de 0,2, 1,5 y 2,0 mL; Nucleótidos (dNTPs); Taq

polimerasa (Hot Start); Cloruro de magnesio ($MgCl_2$). El material de referencia certificado utilizado en la validación: maíz Bt-11, MON810, GA21 (0,1%) y soja Rondoup Ready (0,1%), fue suministrado por el instituto europeo de materiales de referencia (IRMM, Geel, Bélgica).

3.3.2. Equipos

Cubeta de electroforesis; Fuente de electroforesis; Espectrofotómetro (Biofotómetro, Eppendorf); Termociclador; Equipo de fotodocumentación (Bio-Rad); Horno de hibridación; Balanza electrónica analítica con sensibilidad de 0,01 mg; Balanza electrónica analítica con sensibilidad de 0,0001 mg; Agitador con calefacción (Thermomixer comfort); Centrífuga para tubos de 50 mL (Multifuge 3L-R); Centrífuga para tubos de 1,5-2,0 mL (Biofuge fresco); Centrífuga de sobremesa; Micropipetas de volumen variable (0,5-5.000 μ L); Cabina de seguridad biológica; Secador de muestras (a vacío); pHmetro y electrodo; Autoclave; Homogeneizador masticador; Bloque frío; Agitador vibrador de tubos; Sistema de producción de agua grado reactivo (Mili-Q); Software Quantity One; Matraces aforados (10, 25, 50, 100, 250, 1.000 mL); Frigorífico congelador; Cámara frigorífica; Picadora; Microondas; Molinillo de café; Placa multipocillo (96); Mortero.

3.3.3. Condiciones ambientales y preparación de la muestra

Las condiciones ambientales para la realización del ensayo son las condiciones normales de trabajo en el laboratorio, las muestras estarán a temperatura ambiente, para lo cual se sacarán de la nevera con antelación suficiente consiguiendo así atemperar la muestra. Normalmente los productos no necesitan preparación previa.

Las zonas de trabajo deben estar limpias y libres de polvo y restos de materiales que pudieran interferir con el análisis posterior del ADN.

Todas las muestras deben ser homogeneizadas antes de la extracción, con el fin de obtener una muestra representativa -de la muestra- al coger la submuestra para analizar y, para que la solución de lisis acceda mejor a los tejidos y las células y libere de forma eficaz el ADN al medio.

Se pueden utilizar distintos métodos de homogeneización, desde morteros a molinillos, picadoras, etc. El método óptimo de homogeneización dependerá del tipo de muestra. Las semillas, siempre se homogeneizarán en molinillo o picadora, al igual que los frutos secos. Las galletas o el pan se pueden homogeneizar en molinillo, picadora o con mortero. Una sémola de maíz o un paté se puede homogeneizar en homogeneizador de palas con la solución de lisis.

Precauciones. Durante el proceso de homogeneización y pesada, extremar las precauciones para evitar cualquier contacto entre muestras.

Utilizar siempre material desechable para pesar/medir y homogeneizar. Utilizar homogeneizadores esterilizados con lejía y/o UV y limpie la zona de pesada y homogeneización cada vez que se manipulen distintas muestras. En caso de contaminación, se repite el análisis desde el inicio. Antes de repetir el análisis se realizará una limpieza especial en la zona de trabajo y de los equipos implicados. Si la contaminación persiste, se emplearán nuevas alícuotas de todos los reactivos.

Para el análisis de semillas, granos, frutos secos, se homogeneizarán al menos $500 \pm 0,01$ gramos de muestra. Para el análisis de muestras heterogéneas, se homogeneizarán como mínimo $100 \pm 0,01$ g de muestra.

En función del tipo de alimento, la preparación de la submuestra para la extracción de ADN difiere tanto en cantidad de partida como en el volumen de la solución de lisis a añadir. Dependiendo de la muestra de partida, se utilizarán los valores especificados y las cantidades a adicionar de muestra y solución de lisis, se determinarán mediante pesada.

3.3.4. Extracción de ADN

Antes de iniciar la extracción de ADN, es necesario realizar la preparación de los reactivos del kit RNasa y Proteinasa K, tal y como se indica en el Manual de usuario del kit ExtraGen-Alimentos. En primer lugar, descongelar uno de los viales del kit que contienen agua ultrapura estéril, para diluir la Proteinasa K y la RNasa y seguir la secuencia siguiente:

Dar un pulso de centrífuga o spin (tiempo transcurrido en alcanzar la velocidad máxima de giro del rotor y descender a la posición de reposo), para que el contenido del vial quede depositado en el fondo. Disolver con 500 μ L de agua

ultrapura estéril. Incubar el vial de RNAsa a $100 \pm 0,1$ °C durante 15 minutos ± 1 segundo y dejar enfriar. Conservar en frigorífico congelador a temperatura entre -15 °C y -20 °C. Descongelar y agitar con vortex antes de su uso.

Para la extracción de ADN de cualquier alimento –excepto grasas-aceites y lecitinas de soja-, se seguirá el protocolo descrito en el kit ExtraGen – Alimentos, que está especialmente diseñado para la extracción de ADN total a partir de alimentos, tanto de materias primas como de productos elaborados. Para grasas y aceites, se utilizará un protocolo simplificado, utilizando un protocolo específico para lecitinas de soja.

Para cada muestra objeto de ensayo, la extracción de ADN se hará siempre por duplicado, tratando cada réplica como dos muestras independientes. Las muestras que entran al laboratorio se codifican con un número correlativo (código). Así, los duplicados se codificarán con el código de laboratorio, seguido de las letras A (replica 1) y B (réplica 2).

Siempre se ha de realizar en paralelo un Control de Extracción (Cex) de ADN. Se trata de una muestra simulada, que se someterá al mismo procedimiento de extracción que las muestras reales, pero que no contendrá muestra, en su lugar pondremos la cantidad equivalente de tampón de lisis. El análisis posterior del Cex nos indicará la presencia o ausencia de ADN contaminante durante el proceso de extracción de ADN, debida a la contaminación de reactivos o equipos de laboratorio, así como la posible contaminación ambiental o la incorrecta manipulación del analista.

Se establece como criterio de aceptación: resultado negativo para el Cex. Si el resultado es positivo, indica contaminación y por lo tanto, se repite el análisis.

A continuación se describe el protocolo de extracción de ADN:

- Añadir la submuestra al tubo que tiene la solución de lisis. Si el extracto resultante es muy viscoso, de forma que el extracto se mueve con dificultad en el incubador, incrementar el volumen de solución de lisis en $5 \pm 0,01$ mL.
- Añadir 20 μ L de RNAsa y agitar $30 \pm 0,1$ segundos con vortex.
- Incubar a 65 ± 2 °C durante 30 minutos con agitación constante. (Podemos incubar hasta un máximo de 2 horas).
- Centrifugar a 4.600 rpm durante 5 minutos $\pm 0,1$ segundos.

- Transferir 1,5 mL del sobrenadante a un tubo de 2 mL. Si la extracción de ADN se realiza a partir de muestras procesadas de las que se espera un bajo rendimiento (almidones, cereales de desayuno, maíz frito, sopas deshidratadas, zumos, enlatados), realizar el paso anterior con dos tubos y continuar la extracción con ambos.
- Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos \pm 0,1 segundos.
- Importante: Si las muestras son o están compuestas de semillas de soja, piensos, semillas de algodón, harina de soja o proteína de soja, continuar en el paso siguiente. Para cualquier otro tipo de muestra, continuar en el paso (X).
- Transferir 1 mL del sobrenadante a un tubo de 2 mL.
- Añadir 20 μ L de Proteinasa K
- Incubar a 56 ± 3 °C durante 2 horas. Dar un pulso de centrifuga.
- Añadir 750 μ L de cloroformo estabilizado con etanol. Agitar durante $30 \pm 0,1$ segundos.
- Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos \pm 0,1 segundos.
- (X) Transferir 800 μ L de la fase acuosa (fase superior) a un tubo de 2 mL.
- Añadir 600 μ L de cloroformo (estabilizado con etanol). Agitar durante $30 \pm 0,1$ segundos.
- Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos \pm 0,1 segundos.
- Transferir 600 μ L de la fase acuosa (fase superior) a un tubo de 2 mL.
- Añadir 1,2 mL de solución de precipitación (viene en el kit). Agitar.
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente o como máximo 2 horas.
- Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos \pm 0,1 segundos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 700 μ L de la solución salina (viene en el kit) y resuspender el precipitado empleando el vortex. Dar un pulso de centrifuga.
- Añadir 700 μ L de cloroformo estabilizado con etanol. Agitar $30 \pm 0,1$ segundos.
- Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos \pm 0,1 segundos.
- Transferir 650 μ L de la fase acuosa a un tubo de 1,5 mL.

- Añadir 390 μL de isopropanol. Agitar durante $5 \pm 0,1$ segundos e incubar 10 minutos $\pm 0,1$ segundos a temperatura ambiente (o bien 30 minutos $\pm 0,1$ segundos a 5 ± 3 $^{\circ}\text{C}$ en nevera).
- Centrifugar a 13.000 r.p.m. por 10 minutos $\pm 0,1$ segundos a 4 ± 1 $^{\circ}\text{C}$.
- Eliminar el sobrenadante evitando perder el precipitado.
- Añadir 500 μL de etanol al 70%. Agitar empleando el vortex.
- Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 5 minutos $\pm 0,1$ segundos a 4 ± 1 $^{\circ}\text{C}$.
- Eliminar el sobrenadante evitando perder el precipitado.
- Resuspender en 100 μL de agua ultrapura estéril. Si la extracción se ha realizado con dos tubos, resuspender en 50 μL y unir en uno solo teniendo un volumen final (V_f) de 100 μL .
- Conservar el ADN en frigorífico congelador a temperatura entre -15 $^{\circ}\text{C}$ y -20 $^{\circ}\text{C}$. Si se utiliza en un plazo corto de tiempo (inferior a 5 días), mantener entre 4 y 8 $^{\circ}\text{C}$ en frigorífico congelador.

Precauciones. El proceso de extracción de ADN debe realizarse siempre en una zona (del laboratorio) dedicada exclusivamente para este proceso. Nunca debe realizarse en el mismo lugar donde se hace la preparación de la reacción de PCR (campana de seguridad biológica) ni en la sala donde se analizara el resultado de la PCR.

Durante la extracción del ADN hay que hacer especial hincapié en:

- Evitar el splash al abrir los tubos que contienen el extracto de las muestras.
- Evitar el contacto entre los tubos que contienen el extracto de las muestras.
- Evitar el contacto del extracto con los guantes. En caso de que suceda, cambiarlos.
- Cambiar los guantes con frecuencia.
- Cambiar la punta (con filtro en todo momento) siempre que se tome extracto de muestra o cuando se añada un reactivo.
- Colocar los tubos que contienen extracto de la muestra siempre separados.
- Colocar siempre el tubo que contiene el Cex al final.

3.3.5. Cuantificación de ADN

Antes de proceder a la cuantificación, hay que asegurarse de que los parámetros que están introducidos en el espectrofotómetro (biofotómetro) son los adecuados para realizar la cuantificación:

- Longitud de la cubeta: 10 mm
- Unidades de medida: ng/ μ L
- Corrección de A_{320nm}: corrección de la turbidez
- Elección de cuantificación en ssDNA (cadena simple)
- Fórmula de cálculo (ssDNA: 1A_{260nm}= 37 μ g/mL)
- Dilución 15/35 (15 μ L ADN + 30 μ L de agua ultrapura estéril + 5 μ L de NaOH 2N)

Tras ello, se procede a preparar ADN de cadena simple como sigue:

- Rotular 1 tubo de 1,5 mL con la referencia del ADN que se va a cuantificar.
- Añadir al tubo de 1,5 mL, 30 μ L de agua ultrapura estéril.
- Añadir 5 μ L de NaOH 2N.
- Depositar en el tubo correspondiente, 15 μ L del extracto de ADN obtenido. Poner en un tubo también 15 μ L del Cex. Este tubo servirá de blanco para la cuantificación.
- Dar vortex y spin.

Una vez que los viales están preparados, se procede a cuantificar el ADN, siguiendo este protocolo:

- En primer lugar medimos el blanco. Para ello, en una cubeta depositamos 45 μ L de agua ultrapura estéril + 5 μ L de NaOH 2N.
- A continuación, depositar en una cubeta 30 μ L de agua ultrapura estéril + 5 μ L de NaOH 2N y 15 μ L del tubo que contiene el Cex. Comparar el valor obtenido con el del blanco. En este punto detectaremos si hay contaminación en la extracción. Si el resultado

es positivo (≥ 1), indica contaminación y por lo tanto, se repite la extracción de ADN.

- Pulsar la opción de blanco. El aparato marcará 0.
- Programar en el biofotómetro la dilución realizada: 15 μL de ADN + 35 μL . De esta forma, el aparato nos dará como resultado la cantidad de ADN presente en el extracto.
- Añadir a otra cubeta el ADN de la muestra. Pulsar la opción Sample. Anotar el valor de la cuantificación y de los valores de absorbancia (A).
- Repetir este proceso con el resto de las muestras.

Se anotan los resultados en el registro de extracción, procediendo posteriormente a evaluarlos.

El rendimiento de la extracción de ADN es ampliamente variable, según la composición del alimento y del procesado ($<100 \text{ ng}-10 \mu\text{g}$). En general, se obtendrá menos cantidad de ADN cuanto más drásticas hayan sido las condiciones de pH, temperatura, etc. a las que se hayan sometido los alimentos. También depende, en gran medida, de las especies y tejidos que entren a formar parte del alimento.

En alimentos, la relación A_{260}/A_{280} óptima debe estar comprendida entre 1,7-1,9. Este valor se considera adecuado para aplicaciones posteriores de técnicas de PCR. En algunos alimentos muy procesados o con bajo rendimiento en el proceso de extracción, el resultado esperable es más bajo y no por ello el ADN obtenido no es amplificable. Si el valor obtenido es inferior a 1,5; es probable encontrar problemas de inhibición. La A_{320} debe ser aproximadamente 0.

Para el análisis por PCR que se va a realizar, la concentración de ADN óptima es de 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (pondremos 50 ng ya que utilizamos 5 μL en el cóctel de reacción).

Una vez cuantificado el ADN, se procede a diluir -si es necesario- con agua ultrapura estéril a esa concentración. Si se obtiene una concentración de ADN inferior a 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ no se diluye.

En matrices muy procesadas, la cantidad de ADN obtenido, en algunos casos, no alcanzará este rendimiento. En ese caso, se empleará la muestra obtenida directamente de la extracción, sin realizar ningún tipo de dilución.

Hay que tener en cuenta que se necesitaran 20 μ L de la dilución del ADN.

Tras diluir, se procede a realizar de nuevo una cuantificación para verificar la concentración del ADN.

Hay que tomar las siguientes precauciones. Las zonas de trabajo deben estar limpias, libres de polvo y restos de materiales que pudieran interferir con el análisis posterior del ADN.

Durante la cuantificación y dilución del ADN:

- Evitar el splash al abrir los tubos que contienen el ADN de las muestras.
- Evitar el contacto entre los tubos que contienen el extracto de las muestras.
- Evitar el contacto del ADN con los guantes. En caso de que suceda, cambiarlos.
- Cambiar la punta (con filtro en todo momento) siempre que se tome extracto de muestra o cuando se añada un reactivo.
- Colocar los tubos que contienen extracto de la muestra siempre separados.
- No manipular nunca las cubetas sin guantes.

El proceso de cuantificación y dilución del ADN se realizará en la zona donde se realice la extracción del ADN. Nunca debe realizarse en la sala donde se analizará el resultado de la PCR, para evitar contaminaciones cruzadas.

3.3.6. Amplificación de ADN por PCR

Se utilizará el kit AutentiGEN®-GMOscreen, ya que permite detectar las principales variedades de OMG en un porcentaje inferior al 0,1%. La presencia de ADN procedente de vegetales no modificados genéticamente no genera resultados positivos.

Por cada muestra a analizar se realizarán tres reacciones de PCR:

- Reacción Control (con Pre-Master Vegetal).
- Reacción de screening para la detección de P-35S (con Pre-Master Promotor).

- Reacción de screening para la detección de NOS (con Pre-Master Terminador).

Para cada reacción de PCR se incluirá -como una muestra más-, una alícuota del estándar 0,1% de maíz Bt11. Se dispone además de estándar 0,1% de soja RR que podrá utilizarse sustituyendo al de maíz Bt11 cuando fuese necesario (por ejemplo en caso de que se agote y no se disponga de reserva, contaminación). El resultado debe ser siempre positivo. Nos indica la sensibilidad del método.

Además, se incluirán las siguientes reacciones con cada uno de los Pre-Master:

i) Amplificación de los Controles Positivos (CP). Esta reacción tiene como finalidad la comprobación de que los reactivos y equipos implicados en la reacción de amplificación funcionan correctamente. El resultado debe ser siempre positivo para las tres determinaciones, ya que los CP contiene ADN con las secuencias diana para cada una de las tres determinaciones.

ii) Control de PCR. Es una reacción en la cual el ADN es sustituido por agua ultrapura estéril. Esta reacción tiene como finalidad comprobar la ausencia de contaminación durante la preparación de las reacciones de PCR. El resultado debe ser siempre negativo para las tres determinaciones.

iii) Amplificación del Control de Extracción. Esta reacción tiene como finalidad la comprobación de la ausencia de contaminación durante la etapa de extracción de ADN. Es una reacción en la cual el ADN es sustituido por el extracto obtenido a partir del denominado Control de Extracción (Cex).

Una vez determinado el número de reacciones necesarias para la amplificación de cada fragmento, se determinarán las cantidades de reactivos a utilizar.

En la **Tabla III.4** se describe el volumen de los reactivos necesario para llevar a cabo las amplificaciones. Hacer el cálculo considerando siempre una reacción adicional.

La "Master-Mix" o coctel de reacción, es la mezcla de reacción que contendrá todos los reactivos necesarios para la PCR, a excepción del ADN. En la preparación se seguirán las siguientes etapas:

Tabla III.4. Tipo y volumen necesario de reactivos en el coctel de reacción.

Reactivos	Volumen (μL)			
	1 reacción	5 reacciones	7 reacciones	N reacciones
PRE-MASTER	43,8	219,0	306,6	43,8 x N
UNG	1,0	5,0	7,0	1,0 x N
Taq polimerasa	0,2	1,0	1,4	0,2 x N
Total	45,0	225,0	315,0	45,0 x N

i) Descongelar los Pre-Master que vienen en el kit. Dar un vortex suave, un spin y mantener en hielo (bloque frío). La Taq Polimerasa y la UNG se mantendrán en el bloque frío mientras se preparan las reacciones.

ii) Transferir el volumen necesario de Pre-Máster a un tubo estéril de 1,5 mL, previamente rotulado para identificar el Máster-Mix.

iii) Añadir la cantidad necesaria de Taq Polimerasa y UNG. Dar un vortex suave, un spin y mantener en bloque frío.

A continuación, nos encontramos en disposición de preparar las reacciones a incluir en la PCR como sigue:

Rotular los tubos de 0,2 mL con el código correspondiente elegido para la muestra y para la reacción (Pre-Máster).

Añadir 45 μL del Máster-Mix correspondiente a cada tubo de 0,2 mL.

Añadir 5 μL del extracto de ADN y de los correspondientes controles a los tubos que contienen el Máster-Mix. Mezclar suavemente con la pipeta.

De nuevo, se tomarán las siguientes precauciones durante la preparación de las reacciones de PCR:

- Evitar el splash al abrir los tubos que contienen el extracto de las muestras.
- Evitar el contacto entre los tubos que contienen el extracto de las muestras.

- Evitar el contacto del extracto con los guantes. En caso de que suceda, cambiarlos.
- Cambiar los guantes con frecuencia.
- Cambiar la punta (con filtro en todo momento) siempre que se tome extracto de muestra o cuando se añada un reactivo.
- Colocar los tubos que contienen extracto de la muestra siempre separados.
- Colocar siempre el tubo que contiene el Cex al final.

El proceso de amplificación debe realizarse siempre en una sala dedicada exclusivamente para este proceso. Nunca debe realizarse en la sala donde tiene lugar la extracción de ADN ni en la sala donde se analizará el resultado de la PCR.

Una vez colocados los tubos en el termociclador, hay que comprobar que las condiciones de temperatura, ciclos y duración de cada paso, son las adecuadas para el análisis (**Tabla III.5**).

Tabla III.5. Condiciones de PCR. Ciclos térmicos y tiempos en el proceso de amplificación.

Temperatura	tiempo	Ciclos
20 °C	10 minutos	
95 °C	10 minutos	
95 °C	30 segundos	40
60 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	10 minutos	
4 °C	∞	

Completados los ciclos, se procederá al análisis de los amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.3.7. Visualización de amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa

Se prepararan en primer lugar los reactivos necesarios:

i) Tampón TBE 5 X (1 L). Pesar 54 g de Tris-base [Trizma® base (Tris hidroximetilaminometano) SIGMA], 27,5 g de ácido bórico (Panreac) y añadir 20 mL de 0,5 M EDTA (pH 8,0). Disolver en agua destilada y aforar a 1 L. Autoclavar.

ii) EDTA 0,5 M pH 8,0 (500 mL). Pesar 93,05 g de EDTA sal disódica 2-hidrato (ácido Etilendiaminotetracético sal disódica 2-hidrato, Panreac). Disolver en 400 mL de agua ultrapura y ajustar a pH 8,0 con NaOH 2N. El EDTA no se disuelve hasta que la disolución alcance pH 8,0. Aforar a 500 mL y autoclavar. Se guarda a temperatura ambiente y su caducidad es de un año.

iii) Tampón de carga. Lo prepararemos diez veces concentrado (10X) con BPB (Azul de Bromofenol, Merck): 50% (v/v) glicerol (Glicerina para análisis, Panreac), 25 mM EDTA (pH 8,0) y 0,25% de azul de bromofenol.

Para 10 mL, adicionar 5 mL de glicerol, 500 µL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) y 25 mg de azul de bromofenol, enrasando hasta 10 mL con agua ultrapura estéril. El tubo lo identificamos con el código BPB y la fecha de preparación y lo conservamos en nevera. Siempre que se necesite se prepara una alícuota de 2 mL a partir del original, que será la que utilizemos en la sala de electroforesis.

iv) Tampón de electroforesis. TBE 0,5 X (45 mM Tris-borato; 1mM EDTA). El tampón de electroforesis TBE 0,5X se utilizará para disolver la agarosa y para la cubeta de electroforesis. Se preparará 1 L partiendo de TBE 5X: Para ello, se mezclan 100 mL de TBE 5X y 900 mL de agua destilada en una botella ámbar.

v) Preparación de agarosa. En primer lugar, se preparará el portageles para que contenga el gel (según modelo). Se pondrá el peine para que se formen los pocillos y se dejará sobre una superficie nivelada. Para ello:

- Pesar la cantidad requerida de agarosa: para hacer 100 mL de agarosa 2,5% (para separar completamente los fragmentos), pesar en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, 2.5 g de agarosa y añadir 100 mL de TBE 0,5X.
- Disolver y calentar hasta llevar a ebullición en el microondas.
- Una vez se ha enfriado (50-60 °C), añadir 5 µL de la solución de bromuro de etidio (10 mg/mL). La concentración final es de 0,5 µg/mL.
- Mover para mezclar sin hacer muchas burbujas.

- Verter la agarosa en el portageles.
- Una vez solidifica la agarosa, quitar con cuidado el peine.
- Poner en la cubeta de electroforesis, de forma que la dirección de electroforesis sea hacia el ánodo.

vi) Preparación de TBE 0,5X con Bromuro de etidio. Añadir a 1.000 mL de TBE 0,5X, 50 μ L de la solución de bromuro de etidio (10 mg/mL). Rellenar la cubeta de forma que el tampón cubra el gel.

vii) Preparación del marcador de pesos moleculares. El marcador de pesos moleculares (100 pb Ladder) se presenta comercialmente a una concentración de 1 μ g/ μ L. Para utilizarlo en la electroforesis como marcador, es suficiente cargar 25 ng/ μ L. A esta concentración, al cargar 10 μ L se distinguen claramente todos los fragmentos. Es necesario prepararlo con tampón de carga y agua ultrapura.

Mezclar 50 μ L de marcador comercial, 200 μ L de tampón de carga BPB y 1.750 μ L de agua ultrapura estéril. Mantener en nevera a 2 - 8 °C hasta su uso durante un período máximo de 12 meses. Codificación 100 pb/fecha de preparación.

Listos los reactivos, se prepararán las muestras para la electroforesis como sigue:

- En una placa ELISA o parafilm, dispensar 1,5 μ L del tampón de carga BPB.
- Pipetear 15 μ L de la muestra y mezclar con el tampón.
- Cargar los 15 μ L en el gel. Hacerlo con todas las muestras.
- Cargar 15 μ L del marcador de pesos moleculares.
- Cerrar la cubeta y aplicar un voltaje constante de 100V.
- Dejar correr hasta que el azul del tampón haya migrado unos 5,5-6,0 cm.
- Quitar la corriente y ver al transiluminador UV. Para ello ayudados de un guante, sacamos el gel de la cubeta y lo depositamos en el transiluminador (Bio-Rad, Gel Doc 2000).

Anotar el orden de la electroforesis en el registro de electroforesis.

Precauciones durante la preparación de la electroforesis:

- Llevar siempre guantes de látex o de vinilo para trabajar en la sala de electroforesis; el bromuro de etidio es un reactivo mutagénico.
- No transporte nunca material desde esta sala a otras donde se realizan procesos de análisis; puede producirse contaminación con los amplificados.
- Conserve el tampón TBE 0,5X con bromuro de etidio protegido de la luz si no se va a utilizar durante el día, el bromuro de etidio es sensible a la luz.
- Tened cuidado cuando se caliente la agarosa. Puede hervir violentamente si se deja durante mucho tiempo en el microondas.
- Eliminar los restos de agarosa y TBE con bromuro de etidio en un contenedor para residuos peligrosos.

3.3.8. Precauciones y recomendaciones generales. Metodología de trabajo

La capacidad de generar millones de copias a partir de un número reducido de moléculas, hace que la PCR sea una técnica muy sensible y como consecuencia, se requieren una serie de precauciones y de normas en el laboratorio para evitar contaminaciones, es decir, evitar la amplificación de ADN que puede proceder de amplificaciones anteriores o de otra fuente que no sea la muestra que se quiere analizar (por ejemplo de otra muestra que se está analizando paralelamente). Estas contaminaciones generan lo que se denominan falsos positivos: clasificación de una muestra como positiva cuando realmente es negativa.

Dada la extremada sensibilidad de la técnica, es necesario establecer una metodología de trabajo que evite al máximo las contaminaciones.

Los métodos de prevención de contaminaciones se pueden dividir en físicos y bioquímicos.

i) Métodos de prevención físicos. Se dispondrá de áreas de trabajo separadas físicamente con instrumental específico para las distintas fases del proceso de análisis por PCR.

a) Homogeneización y toma de muestra. En ésta zona, se realizará la homogeneización y pesado de las muestras que van a ser analizadas.

b) Extracción de ADN. En ésta zona, se realizará la extracción de ADN de las muestras. Debe estar separada físicamente de la zona donde se realiza la preparación de las reacciones de PCR y de la sala donde se analizan los amplificadores.

c) Preparación de las reacciones de PCR. Se realizarán exclusivamente en la cabina de seguridad biológica.

d) Amplificación. En esta sala se encontrará el termociclador. Es importante que no esté en contacto con otras áreas. Cuando finalizan los ciclos de la PCR, los tubos contienen amplificadores. Si por un error estos tubos se abriesen, podrían dispersarse por el ambiente los amplificadores, contaminando la sala donde se encuentra el termociclador.

e) Análisis de los amplificadores (electroforesis). Esta sala estará totalmente aislada del resto, ya que es aquí donde se analizarán los productos de la PCR (amplicones) que se dispersan fácilmente.

El flujo de trabajo debe realizarse siempre de forma unidireccional, siguiendo el orden expuesto (a-->e). Es muy importante que cada sala tenga material de uso exclusivo (guantes, puntas, reactivos, etc.), para evitar el transporte continuo, y sobre todo hay que evitar el transporte de material entre salas en sentido inverso al expuesto (e-->a).

ii) Métodos de prevención bioquímicos. La principal fuente de contaminación en los laboratorios que realizan análisis por PCR, son los amplicones generados en PCRs realizadas con anterioridad.

Una estrategia altamente eficaz para evitar esta contaminación es el uso de una enzima Uracil-DNA glicosilasa (UNG). Si sustituimos en la mezcla de reacción de PCR el nucleótido dTTP por dUTP, este es incorporado durante la extensión, generándose amplicones que contienen dUTP en lugar de dTTP. Al incluir UNG (viene en el kit AutentiGen-GMOscreen) en la mezcla de reacción de PCR, previamente a la amplificación, incubando durante unos minutos a la temperatura adecuada para el enzima, la UNG hidroliza los fragmentos que contienen dUTP. De esta manera, los amplicones hidrolizados no pueden actuar de ADN molde para la amplificación.

Para evitar que el enzima hidrolice los amplificadores que se generan en la PCR en la cual se ha incluido, la enzima se inactiva desnaturalizando a 95 °C durante 10 minutos.

Para evitar las contaminaciones, se seguirán las siguientes normas generales sobre la manipulación en el laboratorio:

- Limpiar con frecuencia las zonas de trabajo con lejía y posteriormente con etanol 70%.
- Utilizar material desechable para pesar y homogeneizar muestras (guantes, bisturí, cucharas, bolsas, etc.).
- Utilizar siempre puntas con filtro.
- Utilizar siempre guantes sin talco (puede interferir en el análisis) y cambiarlos con frecuencia.
- Limpiar con frecuencia las gradillas que se utilizan para la extracción de ADN y preparación de reacciones de PCR. Hacerlo con lejía.
- Almacenar los reactivos de PCR separados del resto de reactivos.
- Almacenar los reactivos de extracción separados del resto.

En ningún caso se debe transportar material de la sala donde se analizan los amplificadores a otra sala. Si es posible, disponer de luz UV en la sala de preparación de reacciones de PCR (o cabina de flujo laminar equipada con luz UV), y mantenerla encendida unos minutos antes de la preparación de las reacciones.

iii) Reacciones control. Para asegurar la ausencia de contaminaciones durante el proceso de análisis, se incluirán una serie de controles.

a) Control de extracción. Durante la extracción de ADN de la muestra que va a ser analizada por PCR, es importante realizar los mismos pasos de la extracción de ADN sobre una muestra simulada que contiene los reactivos pero no contiene muestra. A esta muestra se le denomina Control de Extracción (Cex). Su análisis posterior por PCR nos indicará si ha habido contaminación durante la etapa de extracción.

b) Control de PCR. Es una reacción de PCR en la cual el ADN se ha sustituido por agua. Nos indicará si ha habido contaminación durante la preparación de las reacciones de PCR.

Si se observa amplificación en alguno de estos controles, el análisis debe repetirse (extracción o PCR, o ambas) antes de llegar a cualquier conclusión sobre los resultados. Se repetirán tantas veces como sea necesario hasta comprobar que todos los controles dan resultado correcto.

IV - IDENTIFICACIÓN DE CARNES POR qPCR

IV - DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES CÁRNICAS EN ALIMENTOS PROCESADOS MEDIANTE qPCR

Los productos alimentarios compuestos por combinaciones de carnes de ternera y cerdo o pavo y pollo son consumidos con bastante frecuencia, más de lo que nos imaginamos, en todo el mundo, por ello se requiere un correcto etiquetado de estos productos, para conseguir un comercio justo.

Con frecuencia los fraudes en especies cárnicas corresponden a desviaciones significativas de los ingredientes declarados, habitualmente menos ternera que cerdo o menos pavo que pollo, dependiendo de las fluctuaciones de precios de mercado. Así, para cumplir con la normativa vigente en cuanto a calidad, seguridad y trazabilidad, se requiere el desarrollo y aplicación de métodos analíticos más sensibles, específicos y de respuesta rápida en los laboratorios de control alimentario. Hasta la fecha, tanto los métodos de PCR en tiempo real basados en la amplificación de ADN (qPCR), como los métodos inmunoquímicos basados en proteínas, han demostrado ser las mejores opciones para la detección y cuantificación rutinaria de especies cárnicas en productos alimenticios.

Así, la qPCR puede aplicarse a la detección (Brodmann y Moor, 2003; Dooley y col., 2004; Fumiere y col., 2006; Mendoza-Romero y col., 2004) y cuantificación (Eugster y col., 2008; Laube y col., 2007; Palisch y col., 2003; Rodríguez y col., 2004) de ADN diana específico de especies cárnicas en alimentos. Sin embargo, para la detección de proteínas animales se utilizan métodos inmunoquímicos, siendo el ELISA aplicado de forma rutinaria, que a pesar de su rapidez y bajo coste, presentan ciertas desventajas (menor sensibilidad y selectividad), respecto a los basados en ADN (Asensio y col., 2008; Giovannacci y col., 2004). Además, dadas las propiedades intrínsecas de las proteínas (termolabilidad), hace que su aplicación en alimentos altamente procesados esté limitada debido a la desnaturalización de proteínas. Para solventar estos inconvenientes, algunas casas comerciales como (ELISA-TEK®) están llevando a cabo nuevos desarrollos, utilizando anticuerpos obtenidos con glicoproteínas resistentes al calor, que podrían estandarizar el empleo

generalizado de métodos basados en anticuerpos para la detección de especies en productos alimenticios, aunque su idoneidad en ensayos cuantitativos no ha sido suficientemente evidenciado.

El procesado de alimentos a altas temperaturas también desencadena la fragmentación del ADN (Meyer y col., 1994), hecho que puede dificultar su detección y cuantificación mediante métodos de PCR. Para solventar este inconveniente, habitualmente se utilizan amplicones cortos, aunque se ha demostrado que los amplicones de aproximadamente 350 pares de bases son adecuados para muestras de carne altamente procesadas (Hird y col., 2006). Así, se han utilizado con éxito este tipo de amplicones en la detección de especies por PCR en conservas (Broderman y Moor, 2003; Laube y col., 2003) y piensos (Fumiere y col., 2006, Prado y col., 2007).

La fragmentación del ADN tras un intenso tratamiento térmico de la muestra, que conduce a la ausencia de amplificación por PCR, se ha propuesto como una herramienta para la determinación la eficacia del tratamiento profiláctico de los piensos para animales (Kingcombe y col., 2001). Estos estudios demostraron la viabilidad de utilizar técnicas de PCR para la detección cualitativa de especies en alimentos procesados y comidas de animales, aunque no existe suficiente información sobre los efectos que tienen los procesos de cocción y esterilización a los que se somete la carne para, por ejemplo, fabricar conservas de albóndigas, en las técnicas de cuantificación por qPCR.

En la bibliografía encontramos algunas evidencias sobre la cuantificación de especies en alimentos sometidos a un procesado suave (Bergerová y col., 2010), o la cuantificación de vegetales MG tras someterlos a un procesado a elevada temperatura (Eugster y col., 2008, Rodríguez y col., 2001), demostrando que es posible, bajo estas condiciones, obtener información cuantitativa mediante qPCR. Sin embargo, la precisión en las determinaciones de las diferentes cantidades de carne en las muestras, está comprometida por la variedad de tipos de tejidos utilizados en la fabricación de alimentos. De hecho, las determinaciones de ADN pueden no coincidir con el contenido real de carne en la muestra si el método se calibra con ADN obtenido de muestras de tejidos (tocino graso, músculo sin grasa y tejido conectivo), diferentes a los que presenta la muestra.

Para solventar este problema, se ha propuesto el empleo de estándares adaptados a la matriz (Eugster, y col., 2009), requiriendo la elaboración de

matrices de referencia con proporciones conocidas de las especies cárnicas a identificar, para obtener resultados cuantitativos precisos y reproducibles.

Con respecto a los detectores, si bien las sondas estándar de hidrólisis Taqman® son más inespecíficas debido a su longitud, las sondas MGB permiten el uso de secuencias de oligonucleótidos más cortas, mejorando la especificidad (Afoninaet y col., 1997, Kutuyavin y col., 2000), que deben ser adecuadas para la amplificación de ADN altamente fragmentado. Así, se utilizaron detectores y sondas marcadas con MGB para identificar dos especies de mamíferos y dos de aves, en mezclas frescas (F) y procesadas (T), evaluando su idoneidad y precisión en los resultados obtenidos tras el proceso de cuantificación. Además, se evaluaron los efectos del tratamiento térmico aplicado en la fragmentación del ADN de las muestras y su influencia en el resultado de la amplificación por PCR.

4.1. ESPECIFICIDAD DE LOS DETECTORES

Para comprobar la especificidad de los detectores (combinaciones de cebadores y sonda para la identificación de una especie determinada), se realizaron ensayos de PCR en los se determinó la relación señal/ruido, R , estimada como la relación entre el C_T medido con un detector sobre el ADN diana (C_s), y el C_T obtenido con ese detector sobre un ADN no específico $C^{s,x}$ según la ecuación $R = 2^{(C^s - C^{s,x})}$. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.1**.

Tabla IV.1. Relación (R) entre de la señal obtenida con los detectores para las cuatro especies sobre ADN específico y no específico.

Detector	ADN molde (100 ng)			
	Vaca	Cerdo	Pollo	Pavo
Bovino	1 ^(a)	6×10^{-5}	4×10^{-7}	6×10^{-6}
Porcino	7×10^{-5}	1	2×10^{-6}	4×10^{-7}
Pollo	1×10^{-5}	9×10^{-6}	1	4×10^{-5}
Pavo	2×10^{-5}	2×10^{-5}	2×10^{-5}	1

a Valores obtenidos de reacciones de PCR que contienen 100 ng de ADN molde, utilizando la ecuación $R = 2^{(C^s - C^{s,x})}$, siendo C^s el C_T del ADN específico del detector y $C^{s,x}$ el C_T obtenido con ese mismo detector sobre el ADN no específico.

Al observar la **Tabla IV.I**, se comprueba la ausencia de reacción cruzada de un detector con ADN no específico, ya que es de 5 a 7 órdenes de magnitud inferior a la señal obtenida con el ADN específico, demostrando que los detectores diseñados son específicos para cada especie. Por otra parte, se comprobó el límite de detección y la linealidad de las rectas patrón, obtenidas representando los valores experimentales C_T frente al logaritmo de la concentración de ADN molde en la reacción de PCR. Los resultados se muestran en la **Figura IV.1**, en la que puede observarse que en el intervalo de concentraciones de ADN molde utilizadas, de 0,032 ng a 20 ng, los valores de C_T registrados presentan una relación lineal con el logaritmo de la concentración de ADN, obteniendo una eficiencia próxima al 100% (se duplica la cantidad de ADN cada ciclo), a partir de los valores de pendiente de las respectivas rectas de calibrado: 1,96 (ternera), 1,94 (cerdo), 1,98 (pollo) y 2,00 (pavo).

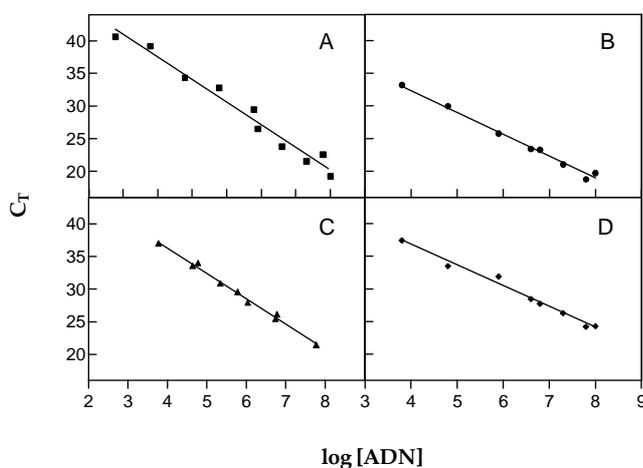


Figura IV.1. Correlación lineal obtenida en la amplificación de ADN con cada uno de los detectores específicos: ternera (A), pollo (B), cerdo (C) y pavo (D).

4.2. LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD DE LOS DETECTORES

Para evaluar los posibles efectos del procesado (cocción de la carne y esterilización), en la integridad y cantidad del ADN diana, sobre la respuesta

lineal de los detectores específicos, comportamiento ya evidenciado en materia prima (Figura IV.1), se realizó un ensayo con ADN obtenido de mezclas de carne de ternera/cerdo (50:50) de la serie (T) y (F), por triplicado. Las eficiencias obtenidas para los detectores BOS1 y SUS en las mezclas 50:50 fueron ($2,2 \pm 0,2$ y $2,0 \pm 0,3$, respectivamente), no siendo estadísticamente diferentes ($p > 0,05$) respecto a las observadas en carne pura de ternera o cerdo ($2,0 \pm 0,1$ y $2,3 \pm 0,3$, respectivamente). Del mismo modo, no se observaron diferencias respecto al valor de eficiencia determinado en las muestras tratadas térmicamente ($2,2 \pm 0,1$ para BOS1 y $2,1 \pm 0,3$ para SUS en mezclas 50:50).

Por lo tanto, se puede afirmar que los procesos de cocción y esterilización aplicados no afectan significativamente a la respuesta de qPCR obtenida para diferentes concentraciones de ADN, y que la presencia de ADN no diana en las mezclas de carne, no afecta a la eficiencia de la PCR. La linealidad de la respuesta también se evaluó utilizando el ADN obtenido de las series F y T, que contenían diferentes proporciones de carne de ternera/cerdo y pavo/pollo. En las reacciones de PCR se utilizaron 4 ng de ADN molde de cada mezcla, representando los valores de C_T frente al logaritmo de la concentración de ADN (Figura IV.2).

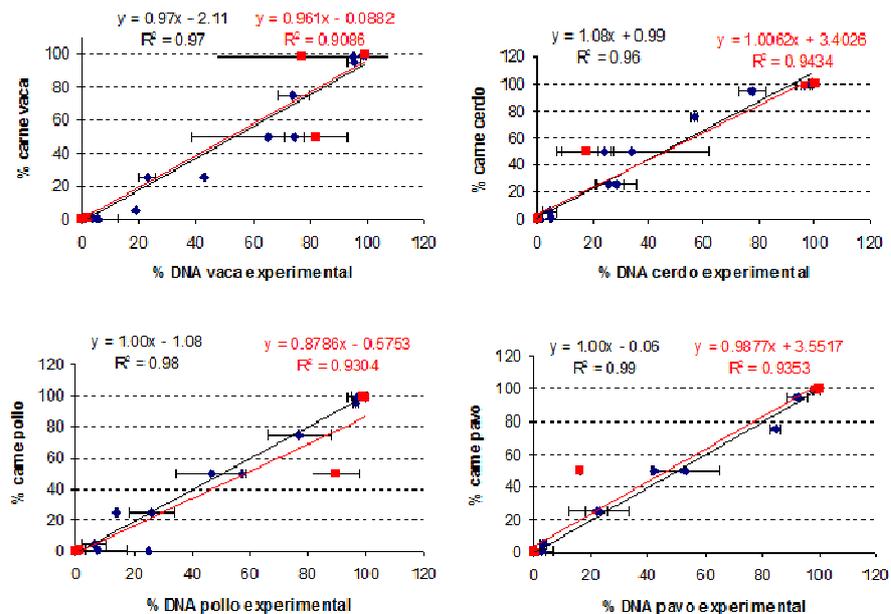
Como se muestra en la Figura IV.2, se obtuvo una correlación lineal tanto en las muestras de la serie F ($R = 0,96-0,99$), como en las sometidas a tratamiento térmico (T), observando una correlación ligeramente inferior T ($R \cong 0,90$). La respuesta lineal obtenida tanto para productos procesados o no, demuestra que los detectores seleccionados pueden ser utilizados con estándares adaptados a la matriz diana, para obtener curvas de calibración fiables para la determinación cuantitativa de las cuatro especies.

Bajo las condiciones descritas, se determinó el límite de detección (LOD) para cada especie mediante la expresión:

$$LOD_{CT} = C_T \text{ NTD} - 3 \times \sigma \text{ NTD}$$

donde LOD_{CT} es el valor máximo de C_T que permite detectar el ADN diana, y C_T NTD y σ NTD, corresponden al valor medio de C_T y la desviación estándar de los controles (NTD), respectivamente. El porcentaje mínimo de carne que se puede detectar se calculó interpolando el valor de LOD_{CT} en la correspondiente curva

estándar, obteniendo un 2% para la carne de ternera, un 7% para la carne de cerdo, y un 8% para pavo y pollo tanto en las muestras de la serie T como de la F.



F

Figura IV.2. Correlación obtenida tras la amplificación de ADN de mezclas binarias. Los valores de C_T vs. log del % de ADN fueron obtenidos por qPCR con los detectores correspondientes y 4 ng de ADN diana de la serie F (línea azul) o T (línea roja).

Para confirmar estos valores de LOD, se compararon los valores de C_T obtenidos con ADN de las series T y F con diferentes porcentajes de cada especie (0,1 y 1 % de ternera/cerdo o pavo/pollo), con los valores obtenidos sobre ADN de muestras control, que contenían sólo una especie. Como se observa en la **Tabla IV.2**, los valores de C_T de las muestras que contienen un 1% de mezcla, permiten identificar de forma fiable la presencia de adulteración en mezclas de ternera/cerdo o pavo/pollo, no sometidas a procesado. Sin embargo, para muestras procesadas, sólo muestra resultados significativamente diferentes al control el detector de ternera, a concentraciones del 1% ($p < 0,05$); aumentando el LOD para el resto de detectores a concentraciones superiores al 5% para ADN extraído de muestras sometidas a tratamiento térmico ($LOD > 5\%$).

Estos resultados concuerdan con los valores de sensibilidad descritos en la bibliografía por otros autores (0,5-1%), en la identificación de especies de ternera/cerdo o pavo/pollo sometidas a un procesado suave, por qPCR (Dooley y col., 2004; Laube y col., 2003; Rodríguez y col., 2005), y valores próximos al 5% en matrices sometidas a un procesado intenso (Laube y col., 2003).

Tabla IV.2. Limite de detección de los detectores específicos en mezclas binarias ternera/cerdo y pavo/pollo.

Detector	C _T serie F			C _T serie T		
	% Especie					
	Control (NTD)	0,1	1,0	Control (NTD)	0,1	1,0
Ternera	26 ±2	24,3 ±0,7 (0,27) ^a	22,2 ±0,9 (0,024)	28 ±2	26,2 ±0,9 (0,267)	23 ±1 (0,017)
Cerdo	26 ±2	24,1 ±1 (0,205)	22,2 ±0,6 (0,026)	31 ±2	28 ±2 (0,158)	27 ±2 (0,082)
Pavo	27 ±0,5	29 ±1 (0,23)	25,7 ±0,6 (0,035)	32 ±1	ND	35 ±3 (0,047)
Pollo	31 ±1	ND	24,8 ±0,3 (0,032)	33 ±2	ND	37 ±2 (0,053)

Valores medios de C_T obtenidos de 4 ensayos independientes con 4 ng de ADN control. a) t-distribución para los valores de p de las muestras vs. ADN control, aparecen entre paréntesis. ND. No detectado.

4.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR PCR E INMUNOENSAYO

Con objeto de comparar los resultados de cuantificación obtenidos con otros métodos disponibles en el mercado, se realizaron ensayos en paralelo sobre las mismas muestras, utilizando kits ELISA comerciales (Tepnel), basados en la detección de proteínas en muestras frescas y procesadas (series T y F). Si bien los kits ELISA permiten identificar vaca y cerdo, no lo hacen para pavo y pollo, dando el resultado conjunto para aves. Los resultados se evaluaron desde el punto de vista cualitativo, asignando un valor positivo a las muestras que dieron una lectura de absorbancia a 450 nm, superior a la del *cut-off* (control positivo establecido por el fabricante 1% e incluido en el kit como una muestra más).

Como se muestra en la **Figura IV.3**, sólo fue posible obtener resultados fiables por inmunoensayo para las muestras de la serie F, ya que los ensayos realizados con muestras procesadas daban resultados erróneos, probablemente debido a la desnaturalización de las proteínas diana durante el tratamiento térmico. En ese sentido, se estableció un límite de detección para vaca, cerdo y aves del 1% mediante ELISA, ya que el valor medio de absorbancia obtenida en ausencia de analito menos tres veces la desviación estándar, fue equivalente a 0,9 veces la señal en ausencia de analito (Gabaldón y col., 2007), que corresponde a un LOD de 0,32 ng/mL de cada especie.

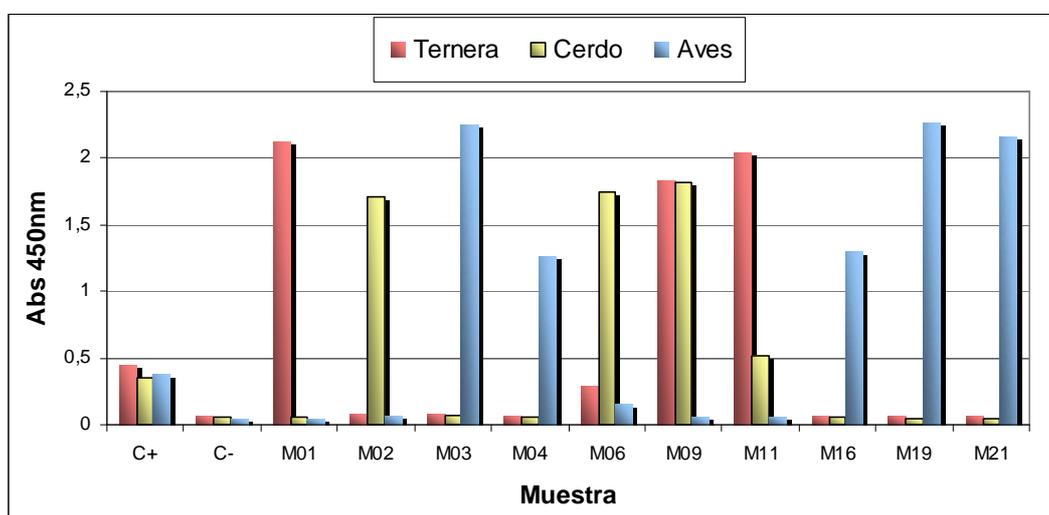


Figura IV.3. Valores de señal obtenidos por inmunoensayo para muestras de la serie F (ver Tabla III.1, sección de Materiales y métodos). Se representan los valores medios de absorbancia correspondientes a tres determinaciones (En todos los casos la desviación estándar fue <10%).

4.4. CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES UTILIZANDO MATRIZ DE REFERENCIA

La principal desventaja de los métodos basados en ADN para la cuantificación de diferentes concentraciones de especies distintas en alimentos, deriva de la variabilidad en la concentración de ADN (número de copias del ADN diana por gramo de muestra), que depende tanto de la especie como del

tipo de tejido presente en el alimento. De hecho, se ha descrito en la bibliografía que en el caso de los productos cárnicos, las mismas cantidades de músculo magro de ternera y cerdo no contienen el mismo número de copias de ADN diana (López-Andreo y col., 2005). También se ha demostrado que el empleo de ADN extraído de material de referencia de la matriz objeto de análisis, que contiene diferentes proporciones de las especies diana, proporciona resultados más precisos que el empleo de diluciones seriadas de ADN para obtener la curvas de calibrado (Eugster y col., 2008). Siguiendo este procedimiento, se obtuvieron las correspondiente curvas de calibrado (**Figura IV.4**), donde se interpolaron los valores de de ADN obtenidos por qPCR de las diferentes mezclas, para determinar las proporciones de cada especie.

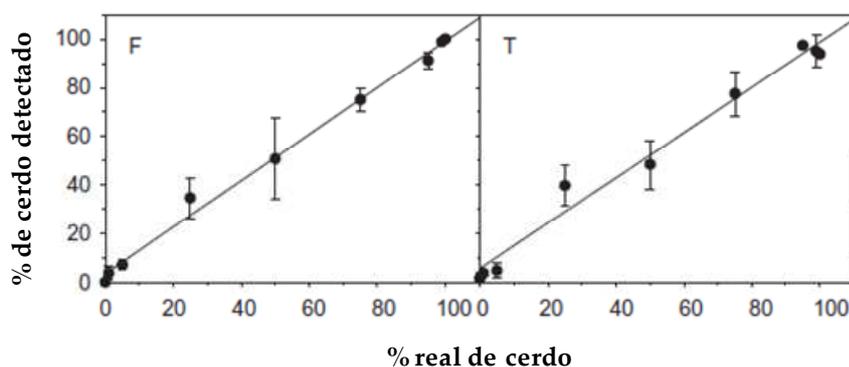


Figura IV.4. Cuantificación de cerdo en mezclas binarias cerdo/ternera (50:50), utilizando estándares de matriz para construir la recta de calibrado. El porcentaje de cerdo determinado en las muestras de las series F y T se calcularon mediante la ecuación (P_{cerdo} ; descrita en la sección de materiales y métodos). Los resultados corresponden a la media de 4 ensayos independientes \pm SD.

Sin embargo, la obtención de materiales de referencia adaptados a la matriz para construir las curvas de calibración puede incrementar el tiempo y coste del ensayo, cuando se requieren diferentes tipos de mezclas. Para simplificar el procedimiento, la combinación de las curvas patrón obtenidas por diluciones seriadas de ADN con datos de qPCR obtenidos de un material de referencia de una sola matriz podría garantizar la cuantificación de resultados de forma fiable.

Así, las diferencias en el número de copias diana entre dos especies o tejidos pueden ser cuantificadas como diferencias en C_T y utilizarse para calcular el porcentaje real de cada especie en las mezclas binarias de carne, determinando los valores de los parámetros D_F y D_T (ver fórmula descrita en la sección de materiales y métodos), a partir del valor de C_T obtenido respectivamente para las mezclas binarias F(50:50) y T(50:50) y los valores de pendiente y ordenada en el origen (m y b), de las rectas de calibrado obtenidas con diluciones seriadas de ADN de las especies puras. Los valores obtenidos $D_F = -12,1$ ciclos y $D_T = -14,3$ ciclos, se utilizaron para ajustar los valores N_{CSUS} para cada mezcla binaria obteniendo el porcentaje de cerdo en las mezclas calculando el parámetro P (ver sección materiales y métodos). Del mismo modo se procedió con las mezclas de pavo y pollo, obteniendo valores de $D_F = -13,5$ ciclos y $D_T = -15,7$ ciclos, que se utilizaron para ajustar los valores N_{CA1} . Como se observa en la **Figura IV.4**, donde se representa el contenido real de cerdo y el cuantificado por qPCR, los resultados obtenidos para las mezclas procesadas o no, mostraron una buena correlación ($R = 0,95$), demostrando la idoneidad y fiabilidad de la aproximación utilizada.

La exactitud, calculada como la desviación estándar relativa (en %) del verdadero valor de cerdo en las mezclas con ternera fue del 17% y del 13% para las muestras de las series F y T, respectivamente; alcanzando valores similares en las mezclas de pollo y pavo (16% y del 19%, respectivamente). Estos resultados concuerdan con los descritos en la literatura por otros autores que utilizan estándares adaptados de la matriz para cuantificar el porcentaje de especies en muestras sometidas a un procesado suave (Eugsteret y col., 2009; Koppel y col., 2009).

La diferencia observada en los valores D para muestras tratadas y no tratadas, aproximadamente de dos ciclos, refleja por ejemplo una disminución de cuatro veces la cantidad de ADN de cerdo amplificable en mezclas tratadas comparado con el ADN de ternera. Este hecho sugiere que el procesado afecta de distinta forma a la amplificación de ADN de cada especie presente en la mezcla, y refuerza la importancia de utilizar estándares de matriz procesada para obtener la recta de calibrado para cualquier ensayo cualitativo o cuantitativo basado en qPCR.

Si comparamos con otros métodos descritos que requieren el desarrollo y empleo de materiales de referencia adaptados a la matriz que cubran todo el

intervalo de porcentajes de carne esperados en la muestra (Eugster y col., 2009), la clonación de secuencias de ADN diana o la determinación del tamaño del genoma (Laube y col., 2007); la utilización de una matriz de referencia de punto único en los ensayos de identificación y cuantificación de especies en alimentos basados en qPCR, como se describe en esta Tesis, puede simplificar tanto el ensayo experimental como el procesado de datos, presentando resultados con mayor agilidad.

Este enfoque podría adaptarse con facilidad a la cuantificación de otros productos alimenticios, ya que sólo requeriría: i) una serie única de curvas estándar de qPCR obtenida a partir de diluciones de ADN de las muestras de referencia de cada especie a analizar, que se pueden utilizar en ensayos de diferentes matrices; y ii) un único punto en la reacción de qPCR que se obtiene a partir de ADN de una muestra de referencia de composición conocida.

4.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA FRAGMENTACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

Los resultados que se muestran en la **Figura IV.4**, sugieren que el procesado térmico aplicado a las carnes utilizadas en esta Tesis (fritura a 65 °C en aceite y esterilización a 121 °C durante 30 min), no afecta significativamente a los resultados cuantitativos obtenidos por qPCR. Sin embargo, se ha evidenciado previamente que dicho tratamiento térmico, puede provocar una fragmentación significativa del ADN (Hird y col., 2006; Kingcombe y col., 2001). Así, para comprobar la posible fragmentación en el ADN en muestras de carne tratadas térmicamente, se diseñó un ensayo controlado por la enzima DNasa para evaluar la integridad del ADN y su efecto en los resultados de qPCR.

Para ello, se hicieron cinco digestiones de ADN con la enzima DNasaI (10^{-3} a 2×10^{-4} U μL^{-1}), para obtener ADN de timo de ternera con diferente grado de fragmentación, cuyo tamaño de banda se confirmó por electroforesis en gel de agarosa. Se diseñaron dos detectores adicionales BOS2 y BOS3, frente a secuencias diana de ADN de ternera de 204 y 319 pb, respectivamente; capaces de amplificar fragmentos de ADN más largos que BOS1.

Se evaluó la eficiencia de amplificación de los nuevos detectores (BOS2 y BOS3), obteniendo un valor muy próximo al 100% (se duplica la cantidad de ADN cada ciclo), similar a la determinada previamente para BOS1.

Los fragmentos de ADN obtenidos en las digestiones con la enzima DNaseI, se utilizaron como molde en las reacciones de qPCR, utilizando como detectores BOS1, BOS2 y BOS3. Las diferencias en las reacciones de amplificación (r), debido a los diferentes tamaños del ADN molde tras la digestión con la DNaseI, se cuantificaron comparando los resultados de amplificación, con los obtenidos utilizando ADN no digerido con la enzima como molde y BOS1 como detector de referencia:

$$r_{1-2} = 2^{(CT_1-CT_2)_{tratada}-(CT_1-CT_2)_{no\ tratada}}$$

$$r_{1-3} = 2^{(CT_1-CT_3)_{tratada}-(CT_1-CT_3)_{no\ tratada}}$$

donde CT_1 , CT_2 y CT_3 corresponden a los valores de CT obtenidos con los detectores nuevos BOS1, BOS2 y el de referencia BOS3, con las muestras de ADN de timo de ternera (*calves thymus*) tratadas o no, con la enzima DNaseI.

Como se observa en la **Figura IV.5A**, incluso a la concentración más baja de DNaseI utilizada ($2 \times 10^{-4} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), la cantidad de ADN amplificado por el detector BOS2 (204 pb), se aproxima a una cuarta parte del ADN amplificado en las muestras no tratadas con la enzima (ADN no digerido); amplificando el detector BOS3 (319 pb), la mitad de ADN que BOS2 en las mismas condiciones de digestión, sugiriendo por tanto que la mayoría de fragmentos de ADN tienen un tamaño inferior a 300 pb.

Como era de esperar, cuando incrementamos la concentración de DNaseI ($2 \times 10^{-4} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), la cantidad de ADN amplificado por el detector BOS2 se reduce a la mitad, no observando diferencias significativas en este caso en los amplificados obtenidos con BOS3, con lo que podemos afirmar que algunos fragmentos de ADN permanecen intactos (no son digeridos), incluso a altas concentraciones de DnaseI (el doble que la inicial). De hecho, si nos fijamos en la **Figura IV.5A**, podemos observar que los tratamientos con elevadas concentraciones de enzima de digestión, parecen reducir la hidrólisis del ADN, debido probablemente a una inhibición de la actividad enzimática a elevadas concentraciones.

Los resultados obtenidos con el ADN sometido a digestión enzimática revelan que los detectores BOS, pueden ser utilizados para evaluar la posible degradación del ADN en productos cárnicos sometidos a procesado térmico. Así,

las muestras de carne de ternera se sometieron a un proceso de fritura habitual en la elaboración de albóndigas (65 °C durante 30 min), esterilizándolas posteriormente, tras introducir el líquido de gobierno y cerrar adecuadamente los botes de conserva metálicos, a 126 °C durante diferentes tiempos (10-30 min), determinando el alcance de la degradación del ADN (parámetro r), utilizando los detectores BOS.

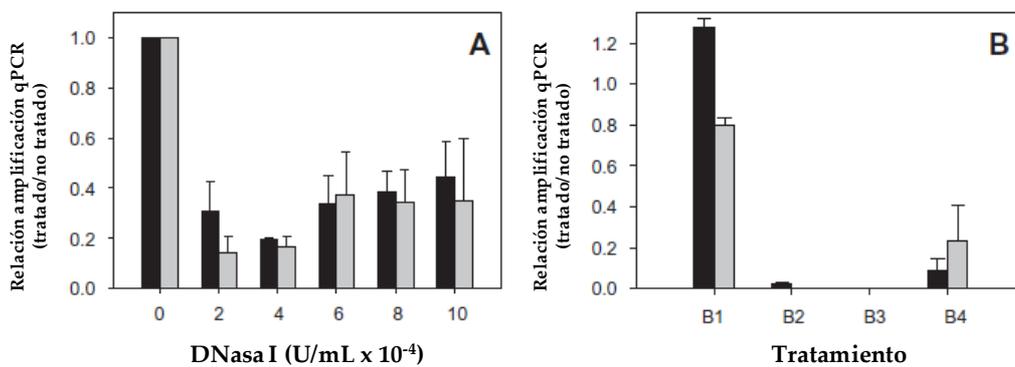


Figura IV.5. Amplificación de ADN por qPCR en muestras sometidas a digestión. **A.** Amplificación sobre ADN de timo de ternera digerido con DNasaI. La relación de amplificación de ADN no digerido y digerido se obtuvo tras incubación con diferentes concentraciones de DNasaI. **B.** Amplificación en muestras de ternera fritas en aceite vegetal a 65 °C durante 30 min, seguido de esterilización a: B2: 126 °C durante 10 min; B3: 20 min y B4: 30 min. B1: muestra control no sometida a esterilización. Las relaciones r_{1-2} (negro) y r_{1-3} (gris) se calcularon mediante las ecuaciones descritas anteriormente.

Como se observa en la **Figura IV.5B**, si bien la amplitud e intensidad del tratamiento térmico no afecta significativamente a la amplificación de ADN con el detector BOS2, si se observa una reducción en la cantidad de ADN detectado con BOS3; indicando que bajo las condiciones experimentales utilizadas, la mayor parte del ADN presenta fragmentos comprendidos entre 200 y 300 pb. De hecho, incluso aplicando períodos de esterilización cortos, observamos una drástica reducción de la señal de fluorescencia obtenida con ambos detectores (BOS2 y BOS3), confirmando una fragmentación del ADN, donde la mayoría de fragmentos presentan un tamaño inferior a 200 pb.

Es importante resaltar que aunque las mezclas binarias de carne de la serie T se sometieron a un proceso de cocinado y posterior esterilización durante 30 min, fue posible detectar y cuantificar el ADN mediante qPCR. Así, se puede afirmar que a pesar de la intensa fragmentación que sufre el ADN, todavía quedan intactas suficientes copias de fragmentos de 100 pb, que puede utilizar como diana el detector BOS1 para obtener resultados cuantitativos por qPCR.

Además, el empleo como material de referencia de una mezcla de carnes adaptada a la matriz, que se somete al mismo tratamiento térmico que las muestras a analizar, para calibrar las concentraciones de ADN de la especie diana en una muestra, solventa la probable reducción de la exactitud en los resultados debido a la disminución de secuencias diana; incluso si el procesado aplicado a las muestras provoca diferente grado de degradación del ADN de cada especie, como revelan las diferencias encontradas en los valores del parámetro D en muestras tratadas y no tratadas.

V - IDENTIFICACIÓN DE CÍTRICOS POR qPCR

V - DETECCIÓN DE MANDARINA EN ZUMO DE NARANJA MEDIANTE qPCR MULTIPLEX

La adulteración más frecuente en el zumo de naranja se debe a la dilución con agua, ya que es enmascarada mediante la adición de azúcar, ácido cítrico o colorante, entre otras sustancias. Por otro lado, la adulteración del zumo de naranja con zumos y/o pulpas procedentes de otras frutas, principalmente cítricos, está adquiriendo una gran relevancia, debido a las fluctuaciones en las cosechas. En general, las metodologías fisicoquímicas para detectar adulteraciones en zumos de frutas se dividen en técnicas analíticas cromatográficas, colorimétricas y espectrométricas (Hammond, 1996), basadas en la determinación del perfil de ciertos marcadores químicos presentes en el zumo, para establecer ratios y rangos estables y fiables que permitan detectar la adulteración en zumo de naranja. Así, se han estudiado los perfiles de minerales, ácidos orgánicos, azúcares, flavonoides y carotenoides o aminoácidos libres (Saavedra, 2001; Gil-Izquierdo, 2001; Navarro, 1988), encontrando diferentes perfiles de polimetoxiflavonas entre *Citrus sinensis* y *Citrus reticulata*, aunque los resultados no han sido concluyentes.

Uno de los métodos analíticos más utilizados para detectar la presencia de adulterantes en un zumo de frutas se basa en la determinación del contenido de sólidos solubles (grados Brix) mediante un ensayo indirecto por refractometría, que establece un nivel mínimo de grados Brix para cada zumo (métodos de análisis y muestreo, CODEX STAN 247/2005). Sin embargo en el caso de los zumos obtenidos a partir de naranja (*Citrus sinensis*), el nivel de grados Brix se solapa con el obtenido en mandarina (*Citrus reticulata*). En este sentido, podemos concluir que, hasta la fecha, ninguna de estas metodologías analíticas ha podido resolver el problema de la adulteración de un zumo de naranja con otros cítricos, incluyendo la mandarina, recurriendo al empleo de marcadores biológicos como el ADN y las proteínas.

Los primeros trabajos se centraron en la búsqueda de diferencias en la composición y estructura de ciertas proteínas del exo, meso y endocarpio de los

cítricos, responsables de las diferencias en la inmunogeneidad de naranjas y limones (Cantagalli, 1972). Sin embargo, estos métodos no eran lo suficientemente específicos como para distinguir entre cítricos. Años más tarde, Sass-Kiss (2000) desarrolló un suero eficaz para detectar un péptido específico de la piel de las naranjas. No obstante, el suero no era selectivo para naranjas, ya que se detectaron reacciones cruzadas con péptidos procedentes de mandarinas. La falta de especificidad, unido al hecho de que las proteínas no se expresan en todos los tejidos del fruto y puede variar su concentración por el proceso de maduración y/o las condiciones de cultivo, aconseja el desarrollo de sistemas analíticos basados en el empleo de ADN como diana.

La aplicación de las técnicas de análisis de ADN en cítricos ha estado centrada en el desarrollo de marcadores moleculares para “mapear” caracteres y genes de interés (Roose, 2000), o para encontrar diferencias filogenéticas en plantas (Moore, 2001). En relación al uso de marcadores genéticos en especies pertenecientes al género *Citrus*, de Araújo (2003) encontró variaciones filogenéticas tras analizar unos fragmentos cloroplásticos ribosómicos (trnL-trnF y trnT-trnL). Años más tarde Chen (2005), describió varios marcadores cloroplásticos de gran utilidad para discriminar especies de cítricos filogenéticamente muy afines. En cuanto a la aplicación de marcadores moleculares para detectar adulteraciones, existe una patente (Keith, 1995) que protege un método basado en un sistema RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA análisis*). Este método permite diferenciar algunas especies de cítricos, aunque no es capaz de discriminar entre especies filogenéticamente cercanas, y mucho menos entre híbridos. Finalmente, Money (2006) bajo la patente descrita previamente por Knight (1998), desarrolló un método para detectar la presencia de variedades de mandarina (*Citrus reticulata*), en zumos de naranja mediante la tecnología PCR-heteroduplex. Sin embargo este trabajo deja fuera del análisis a variedades de mandarina clementina (*Citrus clementina*) y satsumas (*Citrus unshiu*), las cuales son de gran importancia para el sector citrícola. Por otro lado y en relación al desarrollo de marcadores genéticos para detectar adulteraciones de otras especies de cítricos, como el pomelo y el limón, no hay información relevante al respecto, por lo que se hace imprescindible desarrollar marcadores para estas especies que son adulterantes potenciales en zumos de naranja.

Las dos patentes descritas hasta la fecha para detectar adulteraciones de cítricos en zumos de naranja (Keith, 1995; Knight, 1998) se basan en técnicas electroforéticas de los marcadores, previamente amplificados por PCR. Sin embargo, y aunque a priori se tratan de técnicas comúnmente utilizadas en investigación, tienen el inconveniente de que son poco reproducibles, difíciles de estandarizar y además, dependen de metodologías que requieren un entrenamiento específico del personal que las aplica. De hecho es prácticamente imposible desarrollar estándares como material de referencia que permitan introducir el análisis electroforético en un proceso de validación. Además este tipo de técnicas no permiten cuantificar la presencia de mandarina en los zumos de naranja, requerimiento muy importante para el sector de zumos y derivados, y objeto de este trabajo de investigación.

5.1. IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN NUCLEÓTIDOS ENTRE ESPECIES PRÓXIMAS

La región intergénica del gen *trnL-trnF* de cloroplasto se ha utilizado para estudios taxonómicos y poblacionales en la familia *Rutaceae* (Bayer y col., 2009, Groppo y col., 2008; Li y col., 2006). Así, para identificar polimorfismos en nucleótidos que podrían utilizarse potencialmente para la detección de mandarina en mezclas con naranja, se secuenció un segmento de 746 pb, que contiene la secuencia de ADN específica del plásmido naranja (secuencia de referencia Genbank NC_008334, nucleótidos 50974 a 51720) en las nueve muestras de naranja y trece mandarinas suministradas por el IMIDA, mostrando todas las muestras una identidad completa en esta región, con la secuencia de referencia (NC_008334).

Las secuencias de las diferentes variedades de mandarina ensayadas, se corresponden con las descritas con anterioridad en la base de datos Genbank EU369560, EU369550 y EU369537 (Li y col., 2007). Se observa que todas las variedades de mandarina secuenciadas muestran una inserción repetida de 5 pb (AGAAA), que no aparece en las variedades de naranja. Además, se identificaron dos SNP en la región: A → G en la posición 51028, y G → T en la posición 51542, descrita con anterioridad por otros autores (Bayeret y col., 2009; de Araujo y col., 2003; Li y col., 2006). Aunque sería técnicamente posible diseñar

una sonda fluorescente para qPCR, que produjera un solapamiento efectivo con la repetición de 5 pb AGAAAA, el elevado contenido en A, podría dar lugar a uniones inespecíficas, afectando a las prestaciones del ensayo. Cabe destacar que también se detectó el polimorfismo G/T 51542 en las dos variedades de mandarina Satsuma y en Nova, que es un híbrido obtenido de las variedades *C. reticulata* y Tangelo, que a su vez es un híbrido de *C. reticulata* y *C. maxima* (pomelo). El híbrido Fortuna incluido también en este estudio, se obtiene del cruce de dos variedades de *C. reticulata*, y se evidenció que mantiene la misma secuencia consenso de mandarina en esta región, no siendo adecuado el empleo de este polimorfismo para la detección de mandarina, al no presentar diferencias entre diferentes variedades.

Así, se seleccionó el polimorfismo G/T 51542 para demostrar su viabilidad para ser utilizado como diana de las sondas MGB TaqMan® para la detección de mandarina en mezclas de zumos de naranja/mandarina.

5.2. EVALUACIÓN DEL ENSAYO DE qPCR MULTIPLEX

En base a este marcador de secuencia único, se diseñó un sistema de genotipado por qPCR que utiliza un juego de cebadores comunes a ambas especies y dos sondas MGB TaqMan®, específicas de cada especie, marcadas en FAM (naranja) y VIC (mandarina).

Los ensayos preliminares de amplificación realizados con diferentes combinaciones de los detectores (cebadores y sondas), revelaron que las sondas de naranja mostraban cierta hibridación (reacción cruzada) con ADN de mandarina. Para minimizar el grado de inespecificidad, se redujo la T_m de la sonda MGB de naranja acortando la secuencia a sólo 13 nucleótidos; además, se alargó la longitud de los cebadores comunes y la sonda de mandarina para poder utilizar una temperatura más alta (59 °C) en la PCR, en la fase de anillamiento.

La especificidad del método propuesto, que incluye en el mismo vial de reacción los cebadores CTR02F/CTR02R comunes y las sondas Sin3FAM/Ret2-VIC MGB-TaqMan® específicas, se evaluó con ADN procedente de tres variedades de naranja y tres de mandarina (**Figura V.1**).

Como se observa en la **Figura V.2**, que representa las curvas del incremento de fluorescencia (ΔR_n) vs. C_T , no se aprecia fluorescencia debida a ADN de

mandarina cuando sólo hay ADN de naranja en la muestra (no amplifica la sonda Ret2VIC), demostrando así la ausencia de falsos positivos a la hora de detectar mandarina en zumo de naranja.



Figura V.1. Sistemas de reconocimiento de ADN de naranja y mandarina.

Sin embargo, cuando se utiliza como molde el ADN de mandarina, puede aparecer una señal residual de fluorescencia originada por el detector de naranja (Sin3FAM). Esta reactividad cruzada umbral mostrada por la sonda de naranja sería relevante si se utilizara el sistema multiplex, para detectar la adición de naranja a zumos de mandarina, requiriendo en ese caso un ajuste más exacto de la fluorescencia umbral, para evitar falsos positivos.

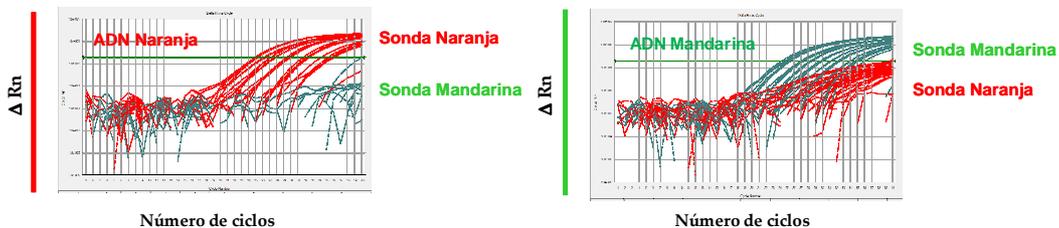


Figura V.2. Especificidad del sistema de reconocimiento de ADN de naranja y mandarina. Cinéticas de la señal de fluorescencia en las reacciones de qPCR obtenidas con las sondas TaqMan MGB de naranja y mandarina en ADN obtenido de hojas de Izquierda: variedades de naranja #1, #2 y #6; y Derecha: variedades de mandarina #17, #18 y #19. Los resultados corresponden a cinco diluciones seriadas (1:5), conteniendo concentraciones de ADN por reacción entre 200 y 0,32 pg. El umbral (línea verde), se estableció a $\Delta Rn = 0,2$.

Para determinar la eficiencia, linealidad y especificidad del ensayo propuesto, se realizaron ensayos de PCR en tiempo real (seis por muestra ensayada), sobre diluciones seriadas de ADN molde de muestras de naranja (*Newhall*, *Navelate*, *Sanguinelli*) y mandarina (*Clemenules*, *Oronules* y *Fernandina*), representando los valores de C_T obtenidos frente al logaritmo de la concentración de ADN en la reacción, obteniendo la correspondiente recta de calibrado mediante la ecuación: $C_T = m \log (\text{ADN}) + b$. Como se muestra en la (Tabla V.1), la respuesta obtenida con cada sonda fue lineal en el intervalo de concentraciones de ADN (0.32–200 pg) amplificado para cada especie por qPCR, con eficiencias próximas al 100% (1,8 y 1,9 para naranja y mandarina, respectivamente) para valores de ADN comprendidos entre 2 y 10^3 copias/mL.

Tabla V.1. Respuesta lineal y eficiencia del ensayo de qPCR utilizando detectores de naranja y mandarina.

ADN	Pendiente (m)	Intersección (b)	R ²	Eficiencia
Naranja	-3,80±0,2	32,92±2,0	0,98	1,8
Mandarina	-3,57±0,4	32,64±2,4	0,98	1,9

Valores medios ± SD de las curvas estándar obtenidas con ADN de las muestras de naranja #1, #2 y #6 y mandarina #17, #18 y #19.

El límite de detección (LOD) de ADN de mandarina se fijó en 0,5 pg, que corresponde al valor de C_T de la muestra control (blanco) menos tres veces su desviación estándar control (Long y Winefordner, 1983). En futuros ensayos y con el propósito de evitar un solapamiento de las curvas estándar de naranja y mandarina debido a su proximidad, se considerará que el número de copias de la secuencia diana, por gramo del ADN total obtenido de las hojas, es idéntico para ambas especies.

5.3. DETECCIÓN DE MANDARINA A PARTIR DE C_{Tc}

La proximidad de la eficiencia obtenida por PCR para naranja y mandarina, a partir de los valores de pendiente de la curva estándar, permite estimar la relación de ADN de naranja/mandarina a partir de la diferencia de las señales de

fluorescencia (C_{Tsin} y C_{Tret}) obtenidas respectivamente con las sondas específicas Sin3FAM y Ret2VIC.

Así, el valor de C_{Tsin} se utilizó como patrón interno y la presencia de mandarina en el zumo se determinó con la ecuación $\Delta C_{TC} = C_{Tret} - C_{Tsin}$ obtenida con el sistema multiplex, que incorpora dos sondas específicas.

Para corroborar esta aproximación, se prepararon mezclas binarias de ADN de naranja, que fueron amplificadas por qPCR utilizando el sistema multiplex, mostrando los resultados obtenidos en la **Tabla V.2**.

Tabla V.2. Diferencias en los valores de C_T obtenidos con los detectores de naranja y mandarina por qPCR utilizando como ADN molde diferentes porcentajes de mandarina en mezclas binarias con naranja.

% de mandarina	C_{Tret}	C_{Tsin}	ΔC_{TC}
0,0	$23,4 \pm 0,2$	$22,7 \pm 0,8$	>16
0,5	$23,4 \pm 0,2$	$23,0 \pm 0,5$	>16
1,0	$36,0 \pm 1,0$	$23,4 \pm 0,2$	$13,0 \pm 1,0$
2,0	32,0	$23,3 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,8$
5,0	$30,0 \pm 1,0$	$22,9 \pm 0,2$	$6,0 \pm 1,0$
10	27,0	23,0	$3,7 \pm 0,4$
20	25,0	23,3	1,8
50	23,0	24,6	-1,3
100	22,0	N.D.	<-18

En las reacciones de qPCR se utilizó como ADN molde 200 pg de la mezcla de mandarina + naranja. Los resultados corresponden a la media de cuatro ensayos independientes. N.D.: no detectado.

Como cabría esperar, los valores de (ΔC_{TC}) muestran una relación inversa con el porcentaje de mandarina en la mezcla. Se observa que las muestras que contienen porcentajes de mandarina inferior al 1%, no dan una señal de fluorescencia medible con la sonda de mandarina tras los 40 ciclos de PCR, mientras que los zumos que contienen el 2% o el 5% de mandarina dan valores de ΔC_{TC} de 9 y 6 ciclos, respectivamente, resultados significativamente diferentes ($p < 0,001$) de los obtenidos con las mezclas que contienen el 1% de mandarina.

Así, se puede establecer el umbral de detección o *cut-off* del ensayo en 10 ciclos; es decir, que las muestras de zumo de naranja que den lugar a valores de $\Delta C_{Tc} < 0$ o iguales a 10 ciclos, serán consideradas positivas para mandarina.

5.4. DETECCIÓN DE MANDARINA EN ZUMOS DE NARANJA

La legislación alimentaria obliga a los fabricantes de zumos y néctares a especificar en el etiquetado las especies utilizadas en su elaboración (EU, 2001), recomendando el empleo de métodos de análisis que permitan detectar la presencia de otras especies vegetales a concentraciones cercanas al 3-5%, que puede considerarse como un umbral razonablemente bajo como para poder diferenciar entre una adición intencionada o bien el resultado de una posible contaminación cruzada motivada por un proceso de limpieza poco efectivo de la línea de fabricación.

Así, para evaluar las prestaciones del sistema multiplex desarrollado para detectar la presencia de bajas concentraciones de mandarina en zumo de naranja, se prepararon diferentes zumos que contenían concentraciones diferentes de naranja y mandarina a partir de concentrado (FC) o no (NFC).

Las muestras de zumo se sometieron a un proceso de extracción de ADN, amplificando el ADN obtenido por qPCR multiplex optimizado previamente, determinando el parámetro DC_{Tc} en cada una de las muestras de zumo. En la **Tabla V.3**, se muestran los resultados obtenidos aplicando el valor de *cut-off* $\Delta C_{Tc} = 10$ ciclos para discernir entre resultados positivos y negativos para mandarina, permitiendo dar resultados positivos en todas las muestras de zumo de naranja que contienen un porcentaje de mandarina superior al 5%, tanto para las preparadas a partir de concentrado (FC), como las no procedentes de concentrado (NFC).

Así, en función de los resultados obtenidos con el sistema multiplex, se estableció un LOD del 5% para mandarina, que se considera suficiente para la mayoría de aplicaciones analíticas, basadas en la identificación del empleo de mandarina como ingrediente no autorizado en zumos de naranja.

Además el umbral establecido es inferior que el descrito con otros métodos de identificación de manzana en zumos de pera (10%) por qPCR (Han y col., 2012).

Tabla V.3. Sensibilidad del ensayo multiplex para la detección de mandarina en zumo de naranja utilizando un ΔC_{Tc} de 10 ciclos como *cut-off*.

Muestra	% de mandarina	$C_{Tret} - C_{Tsin}$	% Positivos
Zumos NFC	0,0	>10	0,0
	1,0	>10	0,0
	3,0	$10,0 \pm 1,0$	60
	5,0	$8,5 \pm 0,8$	100
	10	$7,5 \pm 0,2$	100
	20	$6,2 \pm 0,6$	100
	50	$2,6 \pm 0,3$	100
Zumos FC	0,0	>10	0,0
	1,0	>10	0,0
	3,0	$9,7 \pm 0,8$	80
	5,0	$8,9 \pm 0,9$	100
	10	$7,0 \pm 1,0$	100
	20	$4,2 \pm 1,0$	100
	50	$1,1 \pm 1,0$	100

En los ensayos de PCR se utilizaron 50 pg de ADN extraído de la muestra de zumo. Los valores corresponden a la media de cuatro ensayos independientes.

También se ha alcanzado un umbral de detección similar (5%) para la identificación de mezclas de naranja y mandarina, aunque el método de PCR utilizado se basa en un ensayo heteroduplex (Scott y Knight, 2009), bastante más complejo que el optimizado en esta Tesis.

5.5. DETECCIÓN DE MANDARINA EN ZUMOS COMERCIALES

La detección de ADN en zumos comerciales aplicando el sistema multiplex desarrollado, puede complicarse debido a la variación en el contenido de zumo, la disminución de las secuencias de ADN diana debido al tratamiento térmico y posibles interferencias en la reacción de PCR debidas a la presencia de ciertos aditivos que inhiban la extracción de ADN y la reacción posterior de amplificación. Los zumos comerciales se someten habitualmente a tratamientos

térmicos suaves (pasteurización), que consisten en un calentamiento entre 75 °C y 85 °C, durante 1 y 3 min, llegando a 99 °C en dos tandas de 15 s, enfriando posteriormente a 4 °C, procesado suficiente para evitar el crecimiento de microorganismos y mantener las propiedades organolépticas (Ingallinera y col., 2005; Ros-Chumillas y col., 2007); provocando con frecuencia una fragmentación significativa en el ADN genómico de *C. sinensis*, pudiendo amplificar a pesar de ello fragmentos de 250 pb (Weiss y col., 2007).

Los detectores del sistema multiplex optimizados requieren un fragmento de ADN bastante inferior (77 pb), para ser reconocido por los cebadores CTR02F y CTR02R, que en teoría debe mantenerse incluso tras someter las muestras de zumo a tratamientos térmicos más intensos. Para evaluar las prestaciones de nuestro sistema de detección, se hicieron amplificaciones de PCR sobre ADN obtenido de zumos preparados en nuestro laboratorio (NFC) y comerciales con diferentes mezclas de frutas: grupo A (NFC) mezcla de naranja/uva/naranja sangrina, y B (FC) zumo comercial que contiene, como indica el etiquetado, una mezcla de 10 frutas, incluyendo un 28% de naranja y un 6% de mandarina.

El ADN extraído de cada una de las muestras se utilizó como molde (50 pg), con el detector multiplex para identificar la presencia de mandarina en los zumos, obteniendo valores de C_{Tsin} = 27 y 32 ciclos para la muestra A y B, respectivamente, no detectando señal de mandarina. Para descartar una posible inhibición de la reacción de PCR en el ADN obtenido de los zumos comerciales, se hizo una nueva batería de ensayos añadiendo como control de inhibición 2 µL de ADN (50 pg µL⁻¹) de la muestra #1, a 2 µL de ADN obtenido de la serie A y B, no detectando inhibición tras amplificar por PCR. Este resultado sugiere que ambos valores de C_T obtenidos se corresponden con la cantidad de ADN de naranja o naranja y uva presente en el extracto de la serie A. Hay que resaltar que en la muestra de ADN obtenida del zumo comercial (B), no fue posible identificar la presencia de mandarina utilizando la aproximación ΔC_{Tc} o igual a 10 ciclos, ya que el valor de C_{Tsin} fue sólo de 8 ciclos tras finalizar el proceso de PCR (40 ciclos).

Para poder mantener como límite de detección de ADN de naranja 0,5 pg, hay que tener en cuenta que los zumos que presentan porcentaje de ADN de mandarina >5%, pueden dar resultados positivos con la sonda de naranja (RET2Vic), cuando las reacciones contienen 50 pg de ADN total de zumo (referido

al contenido de ADN de naranja), y por esta razón, el contenido de mandarina en el producto B fue inferior al 5%.

5.6. CUANTIFICACIÓN DE MANDARINA CON EL SISTEMA MULTIPLEX

Aunque inicialmente no se desarrolló como un método cuantitativo, el sistema de PCR dúplex optimizado puede aplicarse a la determinación de porcentajes de mandarina en mezclas con zumo de naranja. Para evaluar la idoneidad, como sistema de cuantificación, del método puesto a punto, se interpolaron los valores de C_T obtenidos con el ADN procedente de las muestras de zumo de las series NFC y FC, en las curvas estándar correspondientes (ver **Tabla V.1**), y los porcentajes de ADN calculados para cada especie, se compararon con las concentraciones reales de naranja y mandarina en los zumos.

Los resultados obtenidos mostraron una correlación lineal entre los porcentajes reales y los obtenidos interpolando en las rectas de calibrado. Sin embargo, se observó una subestimación sistemática en las mezclas que contenían una concentración de mandarina próxima al 50%. Esta ligera desviación podría justificarse si los mismos volúmenes utilizados de naranja y mandarina tanto de zumo como de concentrado, contienen diferentes cantidades de ADN de naranja y mandarina. Es importante resaltar que se obtuvieron resultados discrepantes en la amplificación de ADN mediante un ensayo de PCR heteroduplex, entre los porcentajes de mandarina determinados y los reales (Scott y Knight, 2009).

Para obtener una medida corregida del porcentaje de mandarina en los zumos, se puede utilizar una aproximación similar a la descrita en la identificación de carnes, utilizando como material de referencia un único punto para normalizar los resultados. Así, en la identificación de naranja y mandarina, se utilizó como referencia el zumo NFC que contenía un porcentaje de mandarina del 50%, para determinar el número de ciclos que deben restarse al valor de C_{Tret} obtenido experimentalmente, para obtener la misma cantidad de ADN que la detectada para naranja. Aplicando este factor corrector, se obtuvieron diferencias de 1,4 ciclos en el valor de C_T , que pueden explicarse teniendo en cuenta que en un determinado volumen de zumo de mandarina hay aproximadamente 2,6 veces más de número de copias de ADN de la región trnL-trnF, que en el mismo volumen de zumo de naranja. Sin embargo, esta diferencia no se observó en el

ADN obtenido a partir del tejido foliar y puede deberse a que tengamos diferentes porcentajes de endocarpio/zumo en ambos frutos cítricos, liberando proporcionalmente más células de mandarinas que de naranja durante el proceso de elaboración del zumo. Esta observación refuerza la importancia de utilizar estándares adaptados como material de referencia para calibrar los resultados cuantitativos en alimentos. Para obtener el porcentaje correcto de naranja y mandarina, se restaron 1,4 ciclos al C_{Tret} , se utilizó la ecuación [% mandarina = $100 \times N_{ret} / (N_{sin} + N_{ret})$]; interpolando el resultado en la recta de calibrado, permitiendo así realizar el cálculo con los datos normalizados. Los porcentajes de mandarina en los zumos obtenidos tras normalizar los resultados con la matriz de referencia (muestra que contiene 50% de mandarina), e introducirlos en la ecuación [% mandarina = $100 \times N_{ret} / (N_{sin} + N_{ret})$]; se representan en la **Figura V.3**.

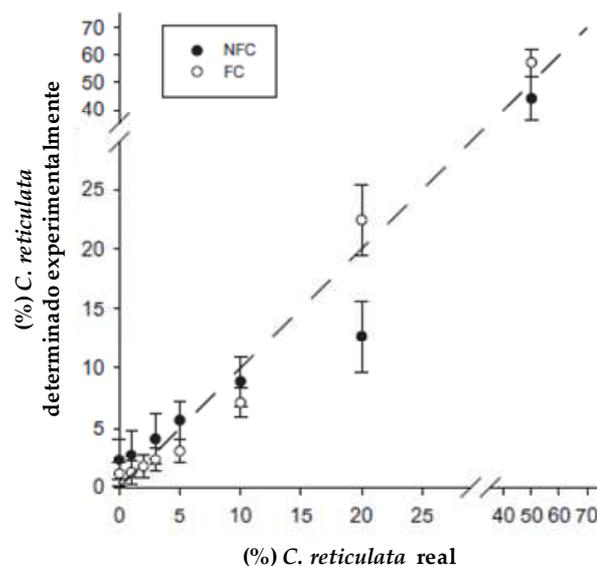


Figura V.3. Cuantificación de mandarina en mezclas de zumo de naranja/mandarina. Las concentraciones de ambas especies en los zumos obtenidos de concentrado (FC) o no (NFC) se determinaron por qPCR a partir de las correspondientes rectas de calibrado, normalizando el resultado con la matriz de referencia (50% de zumo NFC). Las gráficas representan los porcentajes de mandarina reales vs., determinados experimentalmente. Los resultados corresponden a la media de cuatro ensayos independientes \pm SD. Las líneas discontinuas representan los valores esperados.

El error experimental promedio para las muestras que contenían porcentajes de mandarina > 3% fue del 22%, valor aceptable para la mayoría de aplicaciones prácticas. Sin embargo, las desviaciones estándar obtenidas para porcentajes de mandarina próximos al 5% son relativamente altas, cercanas al 30%, comprometiendo la exactitud de las determinaciones cuantitativas obtenidas con la metodología analítica propuesta. A pesar de ello, la aplicación de la metodología en ensayos cuantitativos permite diferenciar porcentajes de mandarina elevados (> 10%) de porcentajes menores (<10%) en la muestra, que puede ser una información de utilidad, tras llevar a cabo el ensayo de identificación de mandarina por el método ΔC_{Tc}

VI - DETECCIÓN DE OMG EN ALIMENTOS Y PIENSOS

VI - DETECCIÓN CUALITATIVA DE MATERIAL VEGETAL TRANSGÉNICO (P-35S Y T-NOS) MEDIANTE PCR EN ALIMENTOS SUSCEPTIBLES DE CONTENER MATERIAL VEGETAL

Las plantas transgénicas contienen tres elementos esenciales: un transgen (el nuevo elemento genético que ha sido introducido para que la planta desarrolle la característica deseada), un promotor (que controla la expresión del transgen en la planta) y un terminador (se encarga de asegurar que el transgen termina adecuadamente, no dando lugar a proteínas quiméricas). Aunque se han identificado algunos promotores y terminadores potenciales, los más utilizados son: como promotor el ARN 35S del fitopatogénico *Caulimovirus* del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) y el terminador NOS, derivado del gen de la nopalina sintasa del *Agrobacterium tumefaciens* (plásmido Ti).

En general, todos los cultivos transgénicos desarrollados contienen el promotor CaMV 35S, el terminador NOS, o ambos genes. Por ello, la posibilidad de detectar estos elementos permite analizar la gran mayoría de cultivos modificados. De hecho, en un estudio realizado en 1997 se comprobó que cualquiera de las dos secuencias estaba presente en 27 de los 28 cultivos genéticamente modificados aprobados por la UE.

Es importante resaltar que tanto el promotor CaMV 35S como el terminador NOS pueden estar presentes -de forma natural- en plantas infectadas con CaMV o *Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente. Así, un resultado positivo no indicaría necesariamente la presencia de material transgénico. Por ello y con el fin de evitar resultados erróneos es fundamental utilizar genes de referencia presentes en una región del genoma de la sustancia a determinar.

Así, se pretende poner a punto y validar un procedimiento específico de trabajo, siguiendo los requisitos técnicos exigidos por la norma ISO 17025 a los análisis cualitativos, que permita identificar de forma fiable y sensible (límite de detección del ensayo 0,1% frente a patrones certificados), material vegetal transgénico (P-35S Y T-NOS) en alimentos y piensos.

6.1. VERIFICACIÓN DE LOS CONTROLES

Una vez realizado el análisis de los amplificadores mediante electroforesis en gel de agarosa, procederemos a interpretar los resultados obtenidos. El propósito de estos controles es verificar la realización óptima del proceso. Es fundamental comprobar que no hay amplificación en ninguno de ellos.

Así, la ausencia de amplificación en los Cex indicará que ningún ADN exógeno ha contaminado las muestras durante el proceso de extracción de ADN.

La ausencia de amplificación en los controles de PCR indicará que ningún ADN exógeno ha contaminado las muestras durante la preparación de la PCR.

Si se observa amplificación en alguno de los Cex, el análisis debe repetirse desde la extracción de ADN a partir de las muestras. Antes de repetir el análisis se realizará una limpieza especial de la zona de trabajo y de los equipos implicados. Si la contaminación persiste, se emplearán nuevas alícuotas de todos los reactivos. El proceso se repetirá tantas veces como sea necesario hasta comprobar que el resultado es correcto (ausencia de amplificación).

Si se observa amplificación en alguno de los controles de PCR, debe repetirse la reacción de amplificación antes de interpretar los resultados. Se procede como en el caso anterior y el proceso se repetirá tantas veces como sea necesario hasta comprobar que el resultado es correcto (ausencia de amplificación).

6.1.1. Verificación de los controles positivos

El propósito de estas reacciones es comprobar que los reactivos y equipos implicados en la reacción de amplificación funcionan correctamente. El resultado debe ser siempre positivo para las tres determinaciones. El tamaño de los fragmentos que se producen con cada reacción es el que aparece en la **Tabla VI.1**.

Si no se observa amplificación en alguno de los CP, debe repetirse la reacción de amplificación, tantas veces como sea necesario hasta que el resultado sea positivo. Con respecto al material de referencia (0,1%), el resultado debe ser siempre positivo.

Una vez comprobados los controles, se procede al análisis de los resultados de las muestras.

Tabla VI.1. Tamaño esperado de los fragmentos en la electroforesis.

CONTROL POSITIVO	PRE-MASTER	TAMAÑO DEL FRAGMENTO
Vegetal	Vegetal	Gen Vegetal 153 pb
Promotor	Promotor	Promotor 35S 138 pb Gen de CaMV 105 pb
Terminador	Terminador	Terminador NOS 147 pb Gen de <i>A.tumefaciens</i> 112 pb

El tamaño del amplificado para la reacción control del gen vegetal es de 153 pb. Este amplificado debe observarse en todas las muestras analizadas. Si no se observa amplificación para alguna de las muestras, hay dos explicaciones posibles: *i*) no hay ADN de origen vegetal en la muestra (o está altamente degradado) o *ii*) hay sustancias inhibitoras de la PCR en el extracto de ADN.

Para diferenciar entre estas dos posibilidades, se hará la reacción sobre el control de inhibición (CI) sobre aquellas muestras en las que el vegetal ha salido negativo, en las que se espere un rendimiento bajo (< 5 ng/μL) o en aquellas cuyo rendimiento de ADN no concuerde con los valores experimentales o se alejen del intervalo de concentración establecido por el fabricante del kit. El CI contiene el ADN diana para la detección del genoma vegetal, a una concentración cinco veces superior al ADN vegetal (CP). Se utilizará únicamente en el caso de realizar pruebas de inhibición.

La finalidad de esta reacción es comprobar que la ausencia de amplificación no es debida a la presencia de inhibidores en el extracto de ADN de la muestra que se analiza, sino a la ausencia de ADN vegetal. Es una reacción que se realiza únicamente con el Pre-Master Vegetal y en la cual, además del ADN de la muestra, se añade 1 μL del CI. Si no hay inhibidores presentes en el ADN, se observará amplificación. En el caso de no observar amplificado, hay que repetir el proceso de extracción de ADN de la muestra.

Una vez comprobada la reacción control, se procede a analizar el resultado de las reacciones de *screening* tras el proceso de PCR y electroforesis en gel de agarosa.

6.1.2. Detección del Promotor

La reacción para la detección del Promotor tiene tres resultados posibles:

a) No se observa amplificación. En este caso se puede concluir que no hay ADN del CaMV ni P-35S procedente de un OMG en la muestra.

b) Se observa un único amplificado de 138 pb (P-35S). En este caso podemos concluir que hay ADN de un OMG en la muestra. Queda descartada la posibilidad de que haya ADN del CaMV en la muestra.

c) Se observan dos amplificados. 138 pb (P-35S) y 105 pb (gen específico del CaMV). En este caso podemos concluir que en la muestra hay ADN procedente del CaMV. La presencia de un OMG no puede descartarse en este caso.

6.1.3. Detección del Terminador

La reacción para la detección del terminador tiene tres resultados posibles:

a) No se observa amplificación. En este caso se puede concluir que no hay ADN de *A. tumefaciens* ni secuencia T-NOS procedente de un OMG en la muestra.

b) Se observa un único amplificado de 147 pb (T-NOS). En este caso podemos concluir que hay ADN de un OMG en la muestra. Queda descartada la posibilidad de que haya ADN de *A. tumefaciens* en la muestra.

c) Se observan dos amplificados: 147 pb (T-NOS) y 112 pb (gen específico del *A. tumefaciens*). En este caso podemos concluir que en la muestra hay ADN procedente de *A. tumefaciens*. La presencia de un OMG no puede descartarse en este caso.

En las **Figura VI.1** (A, B y C), aparecen todos los resultados se pueden observar tras la amplificación, tras aplicar el procedimiento sobre dos muestras de alimentos. Imagen A: 2: Marcador 100 pb; 3: Control positivo vegetal; 4: Estándar de maíz Bt11 0,1%; 5,6: Muestra 1 (duplicados); 7,8: Muestra 2 (duplicados); 9: Cex; 10: Control de PCR. Imagen B: 2: Marcador 100 pb; 3: Control positivo promotor; 4: Estándar de maíz Bt11 0,1%; 5,6: Muestra 1 (duplicados); 7,8: Muestra 2 (duplicados); 9: Cex; 10: Control de PCR.

Imagen C: 3: Marcador 100 pb; 4: Control positivo terminador; 5: Estándar de maíz Bt11 0,1%; 6,7: Muestra 1 (duplicados); 8,9: Muestra 2 (duplicados); 10: Cex; 11: Control de PCR.

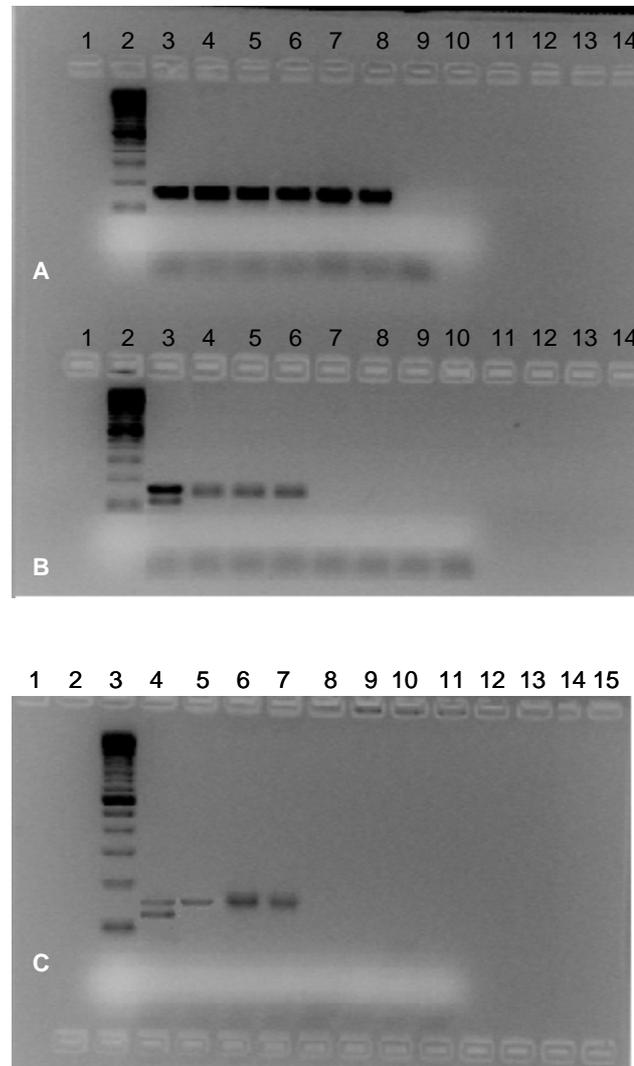


Figura VI.1. Imágenes de electroforesis sobre una muestra de harina de maíz y otra de soja, aplicando el protocolo de PCR optimizado.

Como podemos observar, la muestra 1 contiene OMG. La muestra 2 no contiene OMG, que tenemos que expresar de forma adecuada en el informe de ensayo, identificando el resultado en dos apartados, ya que identificamos dos secuencias distintas P-35S y T-NOS, que pueden estar o no presentes, dándonos una información valiosa sobre el evento, a identificar en una etapa posterior.

Así, se dará un resultado positivo cuando se vea banda de amplificación en la electroforesis y se informará como detectado.

Dando un resultado negativo cuando no se aprecie visualmente banda de amplificación en la electroforesis y se informará como no detectado.

El resultado será indeterminado cuando se observe presencia de la(s) banda(s) correspondiente(s) en la muestra de el(los) fragmento(s) control del Gen CaMV y/o A. tumefaciens, que pueden ser originadas por contaminación.

Siempre se harán duplicados de cada muestra, cuyos resultados deben coincidir siempre. En caso contrario se procederá a realizar una tercera extracción (dirimente), repitiendo el proceso analítico. El resultado correcto será aquel para el que coincidan dos de las tres determinaciones (ejemplo: duplicado 1 detectado promotor, duplicado 2 no detectado promotor, dirimente detectado promotor; el resultado final será detectado para el promotor).

Cuando se observe en la muestra la presencia de alguno de los fragmentos control (CaMV y/o A. tumefaciens), demostrará la presencia de uno de ellos o ambos y quedará reflejado en las conclusiones del informe.

En las conclusiones del informe se hará un resumen global del resultado del ensayo, que se emite tras la observación de los resultados obtenidos para el conjunto de determinaciones efectuadas (controles endógenos, sistema promotor y sistema terminador). Las frases que se incluyen como conclusiones en un informe de ensayo pueden ser cuatro, dependiendo de los resultados obtenidos en cada caso:

a) Cuando todas las determinaciones de material transgénico (P-35S y T-NOS) efectuadas sobre la muestra den un resultado negativo, se añadirá la siguiente conclusión:

No se ha detectado en la muestra la presencia de material transgénico que contenga P-35S y T-NOS.

b) Cuando todas las determinaciones de material transgénico (P-35S y T-NOS) efectuadas sobre la muestra den un resultado negativo y no se detecte la presencia de ADN del control endógeno (vegetal), se añadirán las siguientes conclusiones:

No se ha detectado en la muestra la presencia de material transgénico que contenga P-35S y T-NOS.

No se ha detectado en la muestra la presencia de ADN vegetal.

c) Cuando alguna de las determinaciones de material transgénico (P-35S y T-NOS) efectuadas sobre la muestra den un resultado positivo se añadirá la siguiente conclusión:

Se ha detectado en la muestra la presencia de material transgénico que contiene P-35S y/o T-NOS.

d) Los resultados de las regiones control de los sistemas promotor y terminador (CaMV y *A. tumefaciens*) sólo se pondrán como conclusión cuando el resultado sea positivo, ya que en la mayoría de las muestras el resultado será negativo. Cuando se detecte la presencia de alguna de las dos regiones control se añadirá la conclusión adecuada:

Se ha detectado en la muestra la presencia del virus del mosaico de la coliflor, por lo que no se puede atribuir la detección de P-35S a la presencia de material transgénico.

Se ha detectado en la muestra la presencia de *Agrobacterium tumefaciens*, por lo que no se puede atribuir la detección de T-NOS a la presencia de material transgénico.

Uno de los principios de calidad es llevar a cabo la validación de los diferentes métodos de ensayo, previamente a ser aplicados de forma rutinaria. Con ello, se persigue evaluar la aplicabilidad del procedimiento puesto a punto para la detección de material vegetal transgénico (P-35S y T-NOS) mediante PCR, en harinas, postres lácteos, productos cárnicos, conservas y piensos susceptibles de contener material vegetal.

6.2. VALIDACIÓN DEL KIT EXTRAGÉN ALIMENTOS

La validación del kit Extragen consistió en la utilización de **m** matrices diferentes, realizando en cada una de ellas **n** réplicas o ensayos. Estos (**m**×**n**) ensayos se llevaron a cabo por dos operarios con el fin de estudiar la reproducibilidad. Es decir, el total de pruebas a realizar en la validación es **2**×**m**×**n**.

En primer lugar se procedió a determinar los valores de **m** y **n**, con el fin de realizar un estudio de repetibilidad y reproducibilidad que permita validar al cualquier laboratorio que pretenda utilizar el kit, teniendo en cuenta la restricción intrínseca a cada kit de extracción (500 mL), que condiciona el número total de

ensayos a realizar por cada uno de los operarios, que debe ser menor al número máximo de pruebas que se pueden realizar con un kit Extragen. Así pues:

$$m \times n \leq 25$$

6.2.1. Procedimiento para el estudio de la repetibilidad

Se decidió evaluar la repetibilidad mediante el coeficiente de variación, ya que permite comparar la variabilidad de distintas medidas, sobre todo cuando éstas tienen valores muy diferentes, como es de esperar en nuestro caso, al trabajar con matrices muy distintas en composición, cantidad y calidad del ADN.

$$CV = \frac{s}{\bar{X}}$$

Sin embargo, el inconveniente del empleo del CV radica en la que la distribución de sus valores es muy compleja y depende de la distribución de los datos de origen. Así, resulta difícil fijar un límite para su valor superior. En general, se rechazará la validación si uno o más de los $2 \times m$ coeficientes de variación superan un límite máximo (r).

$$\text{No validar si } CV_{ij} = \frac{s}{\bar{X}} > r \text{ para } (i = 1, 2); (j = 1, \dots, m)$$

6.2.2. Procedimiento para el estudio de la reproducibilidad

Para la evaluación de la reproducibilidad se planteó si es posible aceptar que los dos operarios obtienen el mismo valor medio al aplicar el procedimiento de ensayo y la misma variabilidad, proponiendo dos tests de hipótesis para cada matriz estudiada.

Test para las medias, los dos operarios obtienen el mismo valor medio en sus determinaciones:

$$H_0 : m_1 = m_2$$

$$H_1 : m_1 \neq m_2$$

Test para las varianzas, los dos operarios obtienen la misma variabilidad en sus determinaciones:

$$H_0 : \sigma_1 = \sigma_2$$

$$H_1 : \sigma_1 \neq \sigma_2$$

Así pues, serían necesarios m tests de hipótesis para la igualdad de medias y m tests de hipótesis para la igualdad de varianzas (o desviaciones típicas).

El test de hipótesis planteado para la comparación de medias es el más general, suponiendo que las dos poblaciones tienen varianzas distintas. Para el caso de la comparación de varianzas, utilizaremos el test F modificado, para obtener siempre un ratio mayor que uno. De esta forma se consigue mayor potencia.

6.2.3. Probabilidad del error de primera especie a utilizar en los tests de hipótesis

Puesto que se van a realizar varios tests de hipótesis simultáneamente, hay que considerar un problema asociado a esta situación. En primer lugar, recordemos que cada test de hipótesis lleva asociado una probabilidad de error de tipo I (error de primera especie), α . Esta probabilidad es la de rechazar la hipótesis nula cuando ésta es realmente cierta. El valor de α se prefija habitualmente en el 5% o en el 10%.

En el caso de que realicemos m tests de hipótesis, cada uno de ellos con una probabilidad de error de primera especie igual a (α) , tendremos que el conjunto de tests lleva asociada una probabilidad total del error tipo I (α_T), mayor que la que tienen los tests, ($\alpha_T > \alpha$).

Si suponemos que todas las hipótesis nulas planteadas son ciertas, la probabilidad de que rechacemos al menos una de estas hipótesis nulas es:

$$\alpha_T = 1 - (1 - \alpha)^m$$

En este sentido, establecemos como objetivo general tener controlada la probabilidad (α_T) de la validación del kit Extragen, fijando para ello el valor de α_T igual al 10%, $\alpha_T = 0,1$.

Así, la probabilidad de error de primera especie que se aplicará a cada uno de los tests se determinará con la siguiente expresión:

$$\alpha = 1 - \sqrt[m]{1 - \alpha_T}$$

6.2.4. Elección de los valores de m y n

Teniendo en cuenta los razonamientos descritos anteriormente, se procedió a determinar el número mínimo de matrices distintas (**m**), y el número de réplicas de cada matriz (**n**), necesarias para validar el kit Extragen, considerando la restricción ($m \times n \leq 25$).

En la **Tabla VI.2**, se muestran las combinaciones de **m** y **n** que producen un número total de pruebas por operario menor o igual a 25, tomando como límite inferior $m = 4$, y como límite superior $m = 7$.

Tabla VI.2. Estudio estadístico de las distintas opciones posibles de valores de m y n, a través de la potencia, para detectar diferencias entre ambos operarios.

Matrices (<i>m</i>)	Réplicas (<i>n</i>)	(P) α asociada a cada test	Pruebas por operario ($m \times n$)	(P) detectar diferencias media $d > 1,5$	(P) detectar diferencias sigma $k > 3$
4	6	0,026	24	50%	60%
	5		20	37%	50%
5	5	0,0209	25	32%	45%
	4		20	18%	30%
	3		15	8%	15%
6	4	0,0171	24	15%	25%
	3		18	5%	15%
7	3	0,0149	21	4%	13%

(P): Probabilidad

Cualquiera de las combinaciones que aparecen en la **Tabla VI.2** satisface la restricción en cuanto al número de pruebas totales ($m \times n \leq 25$). Para seleccionar la más adecuada, se aplicaron criterios estadísticos basados en la potencia para detectar diferencias entre los resultados aportados por los dos operarios, que permiten identificar que el Laboratorio tiene problemas de reproducibilidad.

Así, se determinaron las diferencias entre las medias de los dos operarios a través del valor adimensional d :

$$d = \frac{|m_1 - m_2|}{\sigma}$$

Y las diferencias entre sus variabilidades en las medidas, a través del parámetro k :

$$k = \sigma_1 / \sigma_2$$

Estableciendo los siguientes criterios para detectar dichas diferencias:

- Se pretende detectar diferencias de medias mayores que 1,5 ($d > 1,5$), con una probabilidad de al menos un 30%.
- Se pretende detectar diferencias entre las variabilidades, en ratio, mayores que 3, $k > 3$, (equivalente a un ratio de varianzas igual a 9), con una probabilidad de al menos un 30%.

Las curvas de potencia asociadas a cada combinación de valores de m y n , se obtuvieron utilizando el programa Statgraphics (ver **Figura VI.2**), recogiendo los valores paramétricos en la **Tabla VI.2**, marcando en rojo aquellos valores de potencia que no alcanzan los criterios mínimos establecidos para los parámetros (d y/o k), y en verde los que sobrepasan este valor prefijado.

A la vista de los resultados obtenidos en el estudio estadístico, se recomienda el empleo de cinco matrices ($m = 5$) y cinco réplicas ($n = 5$) por operario, ya que se cumplen los criterios mínimos establecidos para identificar diferencias en los resultados; mejor opción que el empleo de cuatro matrices (m) y

cinco o seis réplicas (n), que si bien estadísticamente es una opción viable, implica la evaluación de menos matrices ($m = 4$).

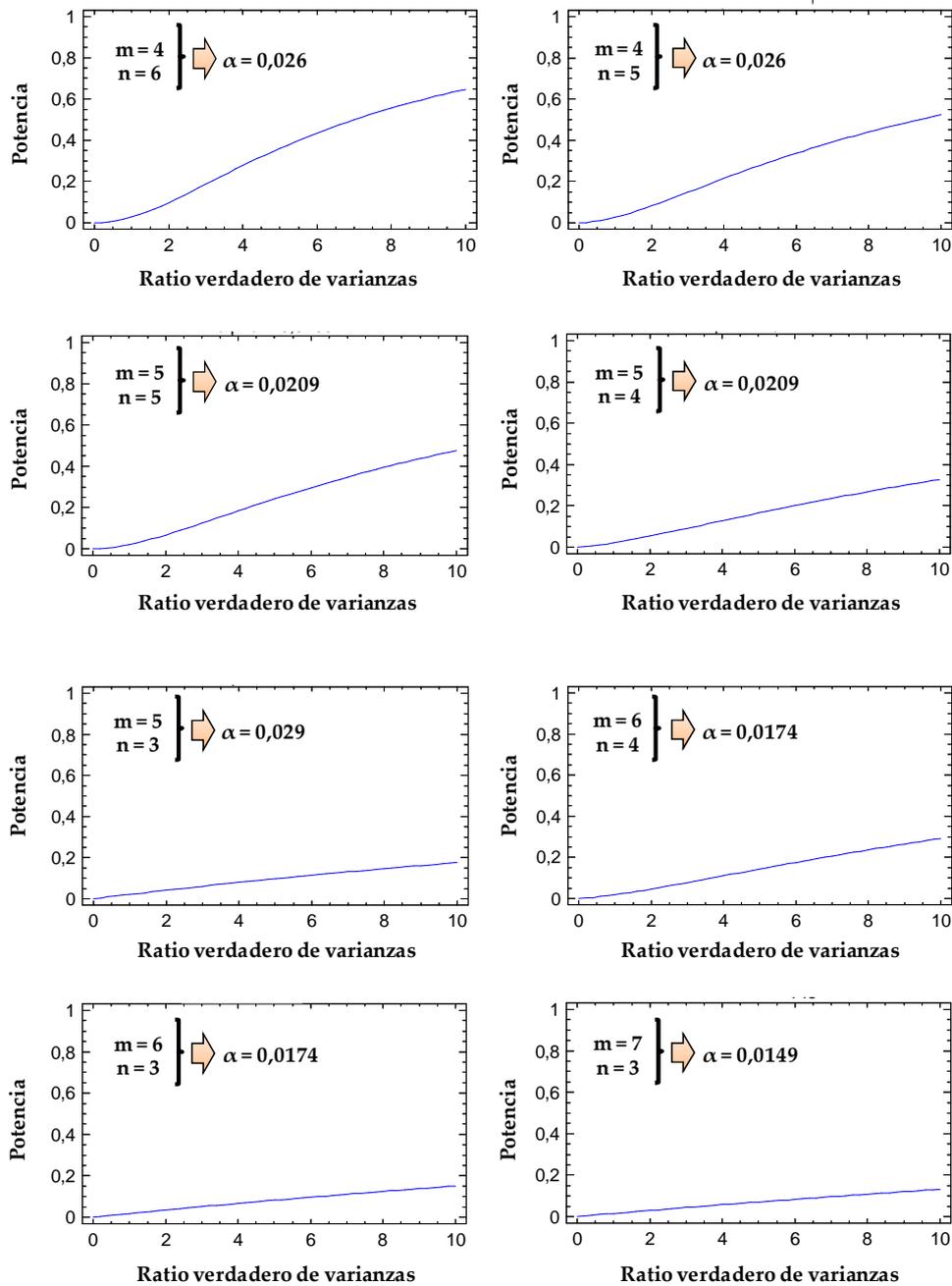


Figura VI.2. Curvas de potencia para la comparación de varianzas.

6.2.5. Elección del valor de corte para el coeficiente de variación

Una vez seleccionados los valores de m y n , pasamos a continuación a seleccionar el valor de corte (r) para el coeficiente de variación (CV).

Debemos tener en cuenta que se van a calcular 10 CVs y la selección del valor r dependerá del número de CVs, ya que al calcular un valor tan grande de CVs aumenta bastante la probabilidad de que alguno de ellos supere ese valor prefijado, sin que realmente tengamos un problema de repetibilidad. Por otra parte, tendremos en cuenta nuestra experiencia previa en la realización de estos ensayos, para estimar entre que valores fluctúa habitualmente el coeficiente de variación. Datos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación revelan que los valores de CV varían en el intervalo (0,13-0,36).

Así, debemos tener en cuenta que la probabilidad de que un valor muestral de CV supere al valor de CV poblacional (σ/m) es muy alta, próxima al 40%. Es decir, que si el máximo observado ha sido 0,36, es muy probable que el valor poblacional sea inferior a ese valor. Para fijar el valor de r , se llevó a cabo la simulación de un caso que se considera representativo utilizando el programa Mathcad, como sigue:

- i) La simulación comienza fijando un valor para r .
- ii) Se supone que los coeficientes de variación poblacional (valor real, no estimado) de las 5 matrices son: 0,13; 0,20; 0,20; 0,25; 0,25; todos dentro del intervalo (0,13-0,36).
- iii) Se simulan 2 valores de CV de cada matriz, como ocurre en la aplicación real de la validación (dos operarios).
- iv) A continuación se determina si alguno de los 10 CVs supera al valor de r . Si es así, se aumenta en una unidad un contador de rechazos, c .
- v) Se repiten los pasos (iii) y (iv) diez mil veces, determinando la probabilidad de aceptar que hay un problema de repetibilidad, sin que realmente lo haya, utilizando el valor r , como $P = c/10.000$.

El valor P determina la probabilidad de error de primera especie, y en consonancia con el criterio establecido para la validación de la reproducibilidad, fijamos este parámetro en un valor cercano al 10%, $P = 0,1$.

Las simulaciones llevadas a cabo considerando un valor de $r = 0,45$ revelan un valor de $P = 0,09$. Por tanto, se recomienda utilizar este valor de r como límite aceptable del coeficiente de variación.

6.2.6. Resultados de la validación del kit Extragén

El diseño seguido para la validación de la extracción de ADN utilizando el kit Extragen, fue el siguiente:

- Los ensayos se realizaron en paralelo por dos técnicos del laboratorio.
- Se tomaron cinco matrices distintas (**m**), en cuanto a composición y grado de procesado (harina de maíz, yogurt de soja, mortadela, maíz en conserva y pienso).
- Se tomaron cinco replicas de cada matriz (**n**).
- Además, cada técnico utilizó un lote de kit diferente en el ensayo (Operario 1: Lote 2500602; Operario 2: Lote 2500603).
- Se tomaron las cantidades de muestra y tampón de lisis que aparecen en el manual aportado por el fabricante (Sistemas Genómicos, S.L), y que se describen en la **Tabla VI.3**.

Tabla VI.3. Cantidades de muestra y volumen de tampón de lisis

MATRIZ	Código	Cantidad de muestra (g ó mL)	Tampón de lisis (mL)
Harina maíz	1	10 g	20
Yogurt de soja	2	10 g	10
Mortadela	3	10 g	20
Conserva de maíz	4	10 g	20
Pienso	5	10 g	20

- Todas las muestras se extrajeron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.4 de materiales y métodos, determinando la concentración de ADN por espectrofotometría UV-Vis, según el protocolo descrito en el apartado 3.3.5 de materiales y métodos.

Además, el procedimiento de validación llevó asociado la estimación o cálculo de los siguientes parámetros:

i) Efecto matricial: Para demostrar que extraemos ADN en las distintas matrices estudiadas, con calidad y rendimiento necesario para el proceso de amplificación, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.6 de materiales y métodos y adecuada visualización posterior en geles de agarosa, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.7 de materiales y métodos. Se establecieron los siguientes criterios de aceptación/rechazo (a/r):

- Cantidad ADN Extraído: Los rendimientos de la extracción deberán estar dentro de los intervalos establecidos por el fabricante.
- Calidad ADN Extraído: Todas las muestras deben ser positivas para el gen vegetal. En caso de resultados negativos las pruebas de inhibición deben ser correctas.

En la Tabla **Tabla VI.4** se muestran los resultados obtenidos por ambos operarios.

Tabla VI.4. Evaluación del efecto matricial utilizando cinco matrices y cinco réplicas por operario.

Matriz	Operario	[ADN] (ng/μL)			CV
		Intervalo aportado por el fabricante	Intervalo experimental	Valor medio	
1	1	(75-1.000)	(88-107)	98,0	0,249
	2		(77-114)	95,5	0,143
2	1	(0,0-10)	(22-26)	24,2	0,068
	2		(22-27)	24,5	0,080
3	1	(50-400)	(349-448)	398,5	0,090
	2		(330-401)	366,0	0,073
4	1	(50-200)	(58-80)	69	0,136
	2		(57-83)	70	0,149
5	1	(75-1.000)	(318-365)	342	0,054
	2		(302-371)	336	0,088

En todos los casos, la concentración de ADN determinada por ambos operarios estuvo dentro del intervalo aportado por el fabricante, amplificando en todos los casos el gen vegetal (Figura VI.3), considerando aceptables los resultados obtenidos.

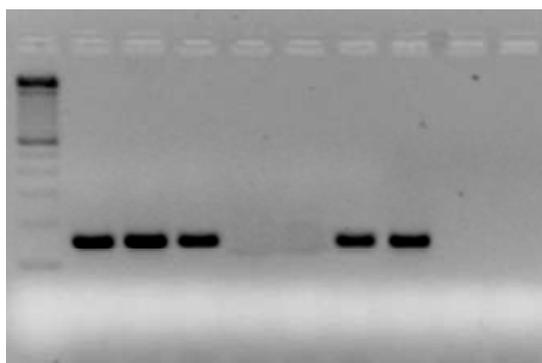


Figura VI.3. Visualización de las cinco réplicas de ADN amplificado de harina de maíz obtenidas por el operario 1. Calle 1: Marcador 100 pb; Calles: 2, 3, 4, 7 y 8: muestra de harina de maíz (cinco réplicas); Calle 5: Cex; Calle 6: Control de PCR.

ii) Repetibilidad: Precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, por el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida. En este caso se evaluaron los datos de cada operador de forma independiente, determinando el coeficiente de variación entre réplicas de una misma muestra, obtenidas por el mismo técnico y el mismo lote de kit, estableciendo como criterio aceptación y rechazo que el valor r para el coeficiente de variación fuese menor del 0,45.

Si observamos los valores de CV obtenidos por ambos operadores (**Tabla VI.4**), en todos los casos son inferiores al valor seleccionado como límite para identificar diferencias en los resultados ($r = 0,45$), ya que se encuentran todos en el intervalo (0,058-0,249), siendo válidos los resultados de repetibilidad obtenidos con el kit Extragén.

iii) Reproducibilidad: Precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mesurando, por diferentes operadores y diferentes equipos de medida. Se estableció el criterio de

aceptación y rechazo mediante un test de hipótesis, determinando que tanto la media y la varianza obtenidas entre los técnicos, para cada una de las muestras analizadas, no fueran significativamente diferentes. Para el cálculo de la media y varianza se utilizaron las siguientes fórmulas:

a) Test de medias

t empírica	Grados libertad (gl)
$t_{emp} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$	$gl = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}}$

Donde los parámetros (\bar{X} y s), representan respectivamente la media y desviación estándar obtenida por cada operador (1 y 2), para las cinco réplicas (n), sobre la misma matriz.

El valor obtenido para la t_{emp} , se compara con el de la t (crítica) con los grados de libertad determinados (redondeando siempre a número entero más próximo), para un valor de $\alpha_T = 0,1$ preestablecido previamente (ver sección 6.2.3), para la validación del kit Extragén para cinco matrices ($m=5$):

$$\alpha = 1 - \sqrt[m]{1 - \alpha_T} = \sqrt[5]{1 - 0,1} = 0,0209$$

Si el valor resultante es inferior a 0,0209, se acepta que no hay diferencias entre ambos técnicos.

b) Test de varianzas

F empírica	F crítica
$F_{emp} = \frac{s_{mayor}^2}{s_{menor}^2}$	$F_{n_1-1, n_2-1}^{\alpha} = F_{5-1, 5-1}^{0,0209} = 10,798$

El valor obtenido para la F_{emp} , se compara con el de la F (crítica) para la validación del kit Extragen para cinco réplicas ($n=5$) para cada matriz. Si el valor resultante es inferior a 10,798; se acepta que no hay diferencias entre ambos técnicos.

En la **Tabla VI.5**, se muestran los valores de los parámetros estadísticos correspondientes al test de medias y al de varianzas, determinados a partir de las concentraciones de ADN ($ng/\mu L$) obtenidas por cada operador, para cada matriz, utilizando un lote de kit Extragen diferente y cinco réplicas por matriz.

Tabla VI.5. Valores de los parámetros estadísticos correspondientes al test de medias y varianzas realizados para determinar la reproducibilidad del kit Extragen.

Matriz	Operario	CV _{empírica}	CV _{crítica}	Comparación medias			Comparación varianzas	
				T _{empírica}	T _{crítica}	gl	F _{empírica}	F _{crítica}
1	1	0,249	0,45	0,210	3,128	6	3,213	10,798
	2	0,143	0,45					
2	1	0,068	0,45	0,176	2,884	8	1,414	10,798
	2	0,080	0,45					
3	1	0,090	0,45	0,875	2,884	8	1,676	10,798
	2	0,073	0,45					
4	1	0,136	0,45	0,262	2,884	8	1,256	10,798
	2	0,149	0,45					
5	1	0,054	0,45	0,755	2,984	7	2,475	10,798
	2	0,088	0,45					

Como se observa en la **Tabla VI.5**, los valores paramétricos obtenidos son inferiores en todos los casos a los criterios de aceptación prefijados, no detectando en consecuencia problemas de reproducibilidad y repetibilidad, por lo que queda validado el kit Extragen.

6.3. VALIDACIÓN DEL KIT AUTENTIGEN GMO SCREEN

La validación del kit Autentigen se basa en la realización de k ensayos procedentes de k réplicas de un estándar (material de referencia certificado). Estos k ensayos se reparten en dos bloques/lotes. Los ensayos correspondientes al lote 1 los realiza el operario 1 ($k/2$ ensayos), mientras que el operario 2 realiza el resto de los $k/2$ ensayos. Sólo elige como criterio de aceptación para la validación del kit Autentigen sólo que todos los ensayos llevados a cabo sobre el material de referencia por ambos operarios sean positivos, es decir, que se alcance el 100% de amplificación. De esta forma se valida, con el mismo criterio, el límite de detección, la reproducibilidad y la repetibilidad.

6.3.1. Selección del número total de ensayos k

En la selección del número total de ensayos k a realizar, se utilizaron de nuevo criterios estadísticos. En primer lugar, designamos como (p_L) a la probabilidad (en tato por uno), que tiene el laboratorio de detectar el límite de detección para un estándar determinado. El valor de (p_L) no es conocido, ya que su determinación precisa requiere la realización de numerosos ensayos para obtener el porcentaje de veces que el laboratorio (representado por los dos operarios), detecta el límite de detección (LOD) al reaizar los k ensayos.

Así, el número de resultados positivos obtenidos tras la realización de esos k ensayos lo designaremos con el parámetro (X), que es una variable aleatoria que se distribuye según una relación binomial de los parámetros k y p_L , como sigue:

$$X = B(k, p_L)$$

Asumiendo así que la probabilidad p_L del laboratorio corresponde a la probabilidad promedio de los dos operarios, ya que en la validación ambos técnicos realizan el mismo número de ensayos. Por ello, la probabilidad de validar al laboratorio se relaciona con la probabilidad de que el número de positivos obtenidos sea igual a k :

$$P(\text{validar}) = P(X = k) = P[B(k, p_L) = k]$$

Como podemos observar en la ecuación anterior, la probabilidad de validar a un laboratorio dependerá de los valores de k y p_L . Si bien el valor de k (número de ensayos a realizar sobre el material de referencia) puede ser prefijado de antemano, el valor de p_L (probabilidad de detectar el LOD) se desconoce, aunque podemos determinar la probabilidad de validar un laboratorio en función de este valor.

6.3.2. Resultados de la validación del kit Autentigen

El diseño propuesto para la validación de la detección de ADN utilizando el kit Autentigen, fué el siguiente:

- Se tomaron tres estándares de referencia (por separado): maíz BT11 (0,1%), maíz GA21 (0,1%) y soja RR (0,1%).

- Cada técnico hizo una extracción diferente de cada uno de los estándares.

- Los ensayos se realizaron en paralelo por dos técnicos del laboratorio sobre cada estándar. Cada técnico realizó 12 réplicas del ensayo ($k = 24$), tanto para el sistema promotor (P-35S) como para el sistema terminador (T-NOS).

- Cada uno de los técnicos utilizó un lote de kit diferente para cada material de referencia.

- Se tomaron las cantidades de material de referencia y tampón de lisis que aparecen en el manual del kit Extragén aportado por el fabricante (Sistemas Genómicos, S.L). Todas las muestras se extrajeron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.4 de materiales y métodos, determinando la concentración de ADN por espectrofotometría UV-Vis, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.5 de materiales y métodos. Para la amplificación por PCR se utilizó en todos los casos una concentración de ADN molde de cada estándar de 10 ng/ μ L, en el cocktail de reacción (Máster-mix) de cada sistema (kit Autentigen), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.6, de materiales y métodos, visualizando posteriormente los amplificadores obtenidos en geles de agarosa, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.7, de materiales y métodos.

Además, el procedimiento de validación llevó asociado la estimación o cálculo de los siguientes parámetros:

i) Límite de detección: El límite de detección en alimentos y piensos ha de corresponder con la cantidad mínima que se puede detectar con una probabilidad elevada. En los análisis de material transgénico se pretende establecer un límite de detección de 0,1% sobre material de referencia certificado, y el resultado obtenido para cada muestra problema se da comparando frente a un estándar certificado. En nuestro caso el resultado será positivo siempre que se detecte el amplificado y negativo cuando no se detecte. Criterio aceptación: Asegurar que en el 100% de los casos se detecta el 0,1% del estándar correspondiente (visualización en gel de agarosa).

ii) Reproducibilidad: Para el estudio de este parámetro, se diseñó un ensayo en el que se modificaron determinadas condiciones, entre ellas: la muestra problema, personal que realiza la extracción y reactivos utilizados en el ensayo. Cada uno de los operadores realizó tres extracciones, una de maíz BT11 (0,1%) otra de maíz GA21 (0,1%) y otra de soja RR (0,1%), sobre cada patrón procesado. Tras ello, se llevaron a cabo 12 reacciones de PCR® para la amplificación del sistema promotor (P-35S) y otras tantas para la amplificación del sistema terminador (T-NOS). Criterio aceptación: Asegurar que se detecta en el 100% de las ocasiones los patrones del 0,1%.

iii) Repetibilidad: Para la valoración de este parámetro se utilizan los datos obtenidos durante el estudio de reproducibilidad, teniendo en cuenta los valores obtenidos por cada operador de forma independiente. Criterio aceptación: Asegurar que se detecta en el 100% de los ensayos los patrones del 0,1%.

En la **Figura VI.4**, se muestra la probabilidad de que el laboratorio se valide, en función de su probabilidad (porcentaje) que tiene realmente ese laboratorio para detectar el material de referencia certificado. Es decir, un valor del eje X igual a 0,95 indica que el laboratorio detectaría el límite de detección el 95% de las veces, si se realizara el ensayo infinitas veces.

Una hoja de cálculo en Excell, permite obtener la curva total (24 ensayos en nuestro caso, en rojo) o individual (un operario, 12 ensayos en nuestro caso, en azul), dando la probabilidad de validación a partir de los valores seleccionados de

k (ensayos a realizar). La selección del valor de k debe hacerse teniendo en cuenta criterios no solamente estadísticos, ya que debemos considerar como factor limitante el número máximo de ensayos que podemos realizar en función del volumen del kit.

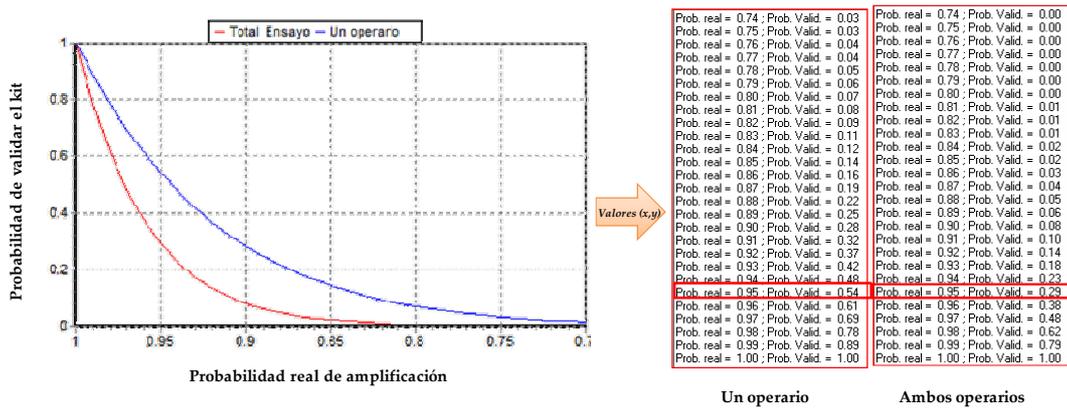


Figura VI.4. Probabilidad de validación del laboratorio en función de su probabilidad real de amplificación. Número de ensayos totales igual a 24 (12 por operario).

Pero sin duda, el objetivo es no validar laboratorios que presenta una probabilidad real de amplificación baja. Por ello, se seleccionaron 24 ensayos, para que la probabilidad de validar a un laboratorio que tenga un porcentaje de amplificación real del 90% sea menor al 10%. Si observamos la **Figura VI.4**, la probabilidad total de validación para ambos operarios (gráfica roja), con un porcentaje de amplificación real del 90%, sería del 8% (0,08); mientras que un laboratorio que obtenga una probabilidad de amplificación del 85%, tendrá una probabilidad de validarse, siguiendo el diseño propuesto, igual al 2%. A su vez, si el laboratorio tiene una probabilidad de amplificación del 95%, tendría una probabilidad de validación del 29%. En definitiva, se pretende no validar el kit cuando el número de resultados positivos aportados por ambos operarios sobre el material de referencia sea bajo.

En nuestro caso, el 100% de los ensayos (24), llevados a cabo sobre cada material de referencia de soja RR (0,1%) y maíz Bt11 y GA21 (0,1%) (**Figura VI.5**) y por ambos operarios, utilizando lotes de kit Autentigen distintos, fueron

positivos para el promotor P35S (Bt11 y RR) y para el terminador NOS (Bt11, GA21 y RR).

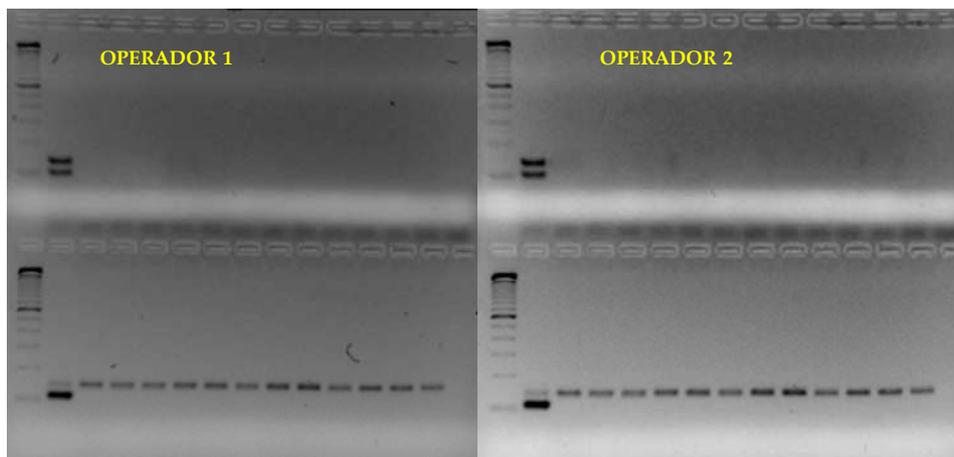


Figura VI.5. Visualización de los amplificados obtenidos por ambos operarios utilizando maíz G21 (0,1%) como material de referencia certificado.

Además, se llevaron a cabo nuevos ensayos utilizando maíz MON 810 (0,1%) como material de referencia, detectando en todos los casos (24 amplificados), el promotor P35S.

6.4. VALIDACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN PARA NUEVAS MATRICES

Puesto que el propósito inicial fue el de validar el método para alimentos y piensos, demostrada la idoneidad y validez de los kit Autentigen y Extragen de Sistemas Genómicos, S.L, para la extracción de ADN en las cinco matrices utilizadas en la validación y para la amplificación de las secuencias reguladoras (P35S y TNOS); a continuación se procedió a evaluar su utilidad en el resto de matrices alimentarias con el objetivo de conseguir un alcance completo en la acreditación del método de análisis.

Así, se establece como regla general que cada vez que se reciban nuevos productos alimentarios, es necesario validar la etapa de extracción de ADN tal y como se indica en el diagrama de flujo de la **Figura VI.6**, clasificando en dos

grupos, los productos que van a ser sometidos a un proceso de validación en alguna de las etapas del ensayo.

a) Productos que no han sido analizados previamente: productos o grupo de productos no incluidos en los ensayos de validación.

Cuando llega un producto que no ha sido analizado previamente, se tomarán las cantidades de muestra y tampón de lisis que aparecen en el registro cantidades de muestra y volumen de tampón de lisis para nuevas matrices. Consideramos productos no analizados previamente a aquellos productos con una composición y características fisicoquímicas totalmente distintas a los productos analizados previamente en el ensayo de validación.

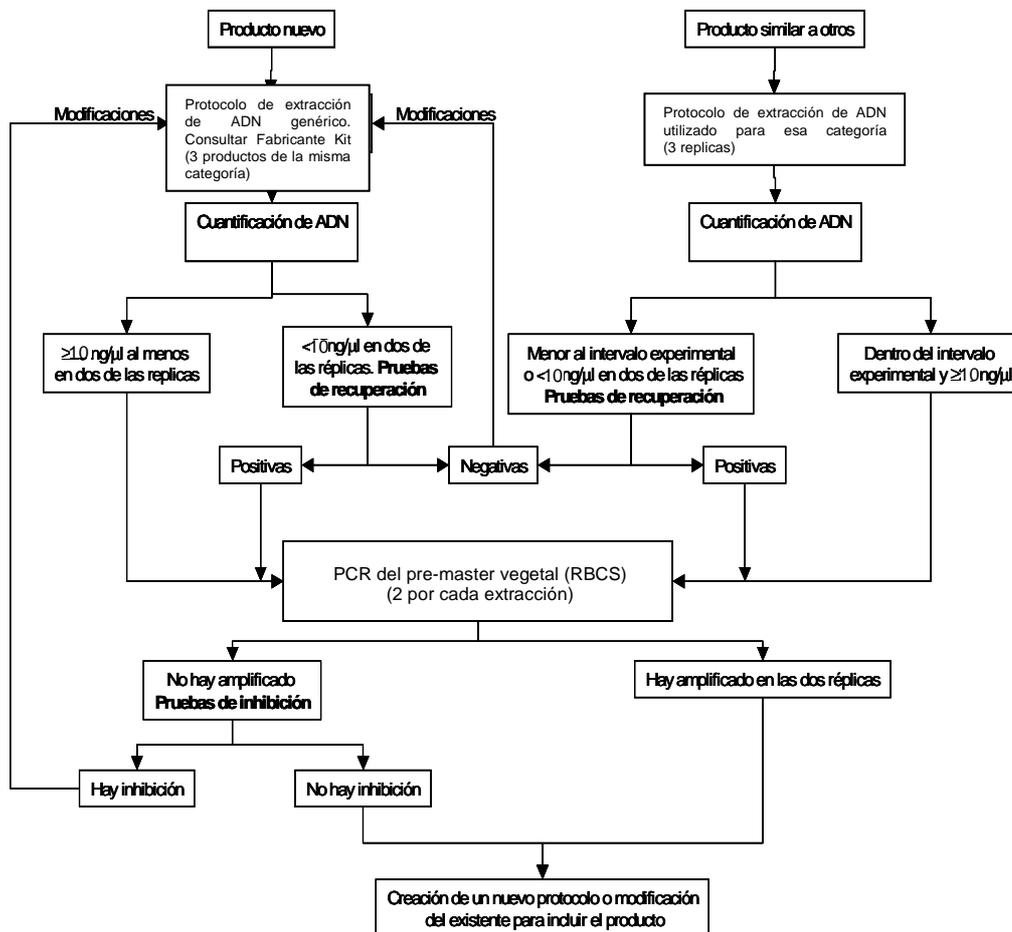


Figura VI.6. Esquema para la validación de la extracción de ADN para nuevas matrices.

b) Productos similares a otros analizados previamente: productos o grupo de productos que tienen un protocolo de extracción validado de forma genérica, pero las características físicas u organolépticas del nuevo producto nos hacen sospechar que será necesario modificar algún paso del protocolo de extracción.

Así, cuando llegue un producto que presenta unas características similares a las de otros productos analizados previamente, se le aplica el protocolo de extracción ya validado. Sobre el protocolo original se pueden realizar modificaciones en función de la evolución de la muestra en el proceso de extracción. Las pruebas se realizarán sobre tres muestras diferentes de la misma categoría. De esta forma obtendremos resultados mas representativos de la categoría de alimentos que se está validando.

Como listado de referencia para determinar las categorías de alimentos se utilizó como base la clasificación que realiza el Codex Alimentarius, agrupando todos los productos alimentarios en las categorías siguientes:

- I. Categoría 1. Productos lácteos y productos análogos, excluidos los productos de la categoría 2.
- II. Categoría 2. Grasas y aceites y emulsiones grasas.
- III. Categoría 3. Hielos comestibles incluidos los sorbetes.
- IV. Categoría 4. Frutas y hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y aloe vera), algas marinas y nueces y semillas.
- V. Categoría 5. Confitería.
- VI. Categoría 6. Cereales y productos a base de cereales, derivados de granos de cereales, de raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas, excluidos los productos de panadería de la categoría 7. La categoría 6, se ha dividido a su vez en dos categorías, ya que se obtienen rendimientos diferentes:
 - VI.1. Categoría 6a. Se incluyen matrices como por ejemplo harina, sémola, etc., cuyos rendimientos de ADN tras la extracción oscilan entre 25 a > 100 ng/ μ L.

- VI.2. Categoría 6b. Se incluyen matrices como por ejemplo almidón, maizena, etc., cuyos rendimientos de ADN tras la extracción oscilan entre 0 a > 10 ng/μL.
- VII. Categoría 7. Productos de panadería.
- VIII. Categoría 8. Carne y productos cárnicos, incluidas aves de corral y caza.
- IX. Categoría 9. Pescado y productos pesqueros, incluidos los moluscos, crustáceos y equinodermos.
- X. Categoría 10. Huevos y productos a base de huevo.
- XI. Categoría 11. Edulcorantes, incluida la miel.
- XII. Categoría 12. Sales, especias, sopas, salsas, ensaladas, productos proteínicos (incluidos los productos proteínicos de soja) y productos fermentados a base de soja.
- XIII. Categoría 13. Productos alimenticios para usos nutricionales especiales. La categoría 13, se ha dividido a su vez en dos categorías, ya que se obtienen rendimientos diferentes:
- XIII.1. Categoría 13a. Se incluyen matrices como por ejemplo papillas, potitos, etc., cuyos rendimientos de ADN tras la extracción oscilan entre 0 a > 25 ng/μL, superiores al esperado para lecitinas.
- XIII.2. Categoría 13b. Se incluyen lecitinas de soja cuyos rendimientos de ADN tras la extracción, a pesar de que oscilan entre 0 a > 25 ng/μL, lo normal es que sean bajos, próximos a cero, ya que son matices muy procesadas, además, tenemos un protocolo de extracción específico para lecitinas.
- XIV. Categoría 14. Bebidas, excluidos los productos lácteos.
- XV. Categoría 15. Aperitivos listos para el consumo.
- XVI. Categoría 16. Alimentos compuestos (que no pueden clasificarse en las categorías 1 a 15).

Las pruebas se realizaron sobre tres muestras diferentes incluidas en la misma categoría, obteniendo de esta forma resultados mas representativos de la categoría de alimentos que se esta validando. Todas las muestras se extrajeron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.4 de materiales y métodos, determinada la concentración de ADN (apartado 3.3.5 de materiales y métodos) se amplificaron, visualizando los resultados obtenidos en geles de agarosa,

siguiendo los protocolos descritos en los apartados 3.3.6 y 3.3.7, de materiales y métodos, respectivamente. En la **Tabla VI.6**, se muestran los resultados obtenidos con siete categorías de alimentos recogidas en el CODEX, cuyos intervalos de concentraciones de ADN obtenidos experimentalmente coinciden con los aportados por el fabricante.

Tabla VI.6. Cantidades de muestra, volumen de tampon de lisis e intervalo de concentraciones de ADN para la validación de nuevas matrices incluidas en el CODEX.

Categoría CODEX	Matriz	Muestra (g ó mL)	T. Lisis (mL)	[ADN] (ng/μL)	
				Intervalo aportado por el fabricante	Intervalo experimental
1.2	Yogurt	10	10	(0,0-10)	(22-27)
1.5	Leche polvo	10	20		(2-5)
1.6	Queso	10	10		(438-415)
2.1	Aceite oliva	12	10	(0,0-10)	(1-2)
2.2.1.2	Margarina	12	10		(1-4)
2.2.1.1	Mantequilla	12	10		(1-3)
4.1.1	Uva	10	10	(0,0-25)	(106-126)
4.2	Pimiento	10	10		(25-33)
4.1.2.4	Tomate frito	10	10		(1-3)
5.1.3	Crema cacao	5	40	(0,0-25)	(1-4)
5.1.1	Chocolate	5	40		(0-2)
5.1	Chocolate leche	5	40		(2-6)
6.1	Sémola	10	20	(25-100)	(48-56)
6.0	Puré	5	40		(21-29)
6.4	Pasta	10	20		(82-94)
7.1	Pan	5	20	(5,0-100)	(45-52)
7.2.1	Galletas	5	20		(137-146)
7.2.2	Donut	5	20		(241-253)
9.2.2	Pescado rebozado	10	20	(10-200)	(17-25)
9.3	Atun conserva	10	20		(8-11)
9.3.3	Caviar	10	20		(2-7)

6.5. PRUEBAS DE RECUPERACIÓN PARA LA VALIDACIÓN DEL PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Las pruebas de recuperación de ADN se realizaron sobre los productos en los que tras la extracción con el kit Extragen, al cuantificar el ADN se obtuvo un valor inferior a 10 ng/ μ L, o bien no se encontraba en el intervalo de concentraciones aportado por el fabricante para el alimento en cuestión (**Tabla VI.7**).

Tabla VI.7. Rendimientos de ADN esperados empleando el kit Extragen (manual del kit aportado por Sistemas Genómicos, S.L), en función del tipo de alimento.

Alimento	Rango de valores esperado	Alimento	Rango de valores esperado
Salsa tomate	0->25 ng/ μ L	Galletas	5->100 ng/ μ L
Colorante alimenticio	0->25 ng/ μ L	Harina y proteína soja	100->300 ng/ μ L
Sopa de sobre/papillas	0->25 ng/ μ L	Derivados cacao	0->200 ng/ μ L
Harina de maíz	75->1000 ng/ μ L	Maíz frito	5->70 ng/ μ L
Sémola	25->100 ng/ μ L	Cereales desayuno	5->100 ng/ μ L
Almidón	0->15 ng/ μ L	Leche de soja	25->200 ng/ μ L
Semillas	50->200 ng/ μ L	Yogurt	0->10 ng/ μ L
Productos cárnicos	50->400 ng/ μ L	Atún enlatado	10->200 ng/ μ L
Derivados pescado	10->200 ng/ μ L	Filete de pescado	50->300 ng/ μ L

Las pruebas de recuperación (ver diagrama de flujo **Figura VI.7**) consistieron en realizar 9 extracciones: tres sobre los productos problema (C), tres sobre un patrón de referencia (1g de harina de trigo) (A), y otras tres sobre los productos problema a los que se les añade 1g de patrón de referencia (B), que debe amplificar siempre, si no hubiese amplificación, la reacción estaría inhibida.

Las pruebas de recuperación se realizan siempre empleando el protocolo diseñado para el producto problema.

Tras realizar la extracción y antes de proceder a la comparación de los rendimientos obtenidos, se debe comprobar que el rendimiento del patrón en todas las extracciones supera los 10 ng/ μ L. En caso contrario, se deben volver a diseñar las pruebas de recuperación. Esto puede ocurrir cuando el protocolo que se aplica al patrón de referencia no es el óptimo, por tanto, se ha establecido como límite de comparación, una extracción mínima de 10 ng/ μ L sobre el patrón de referencia.

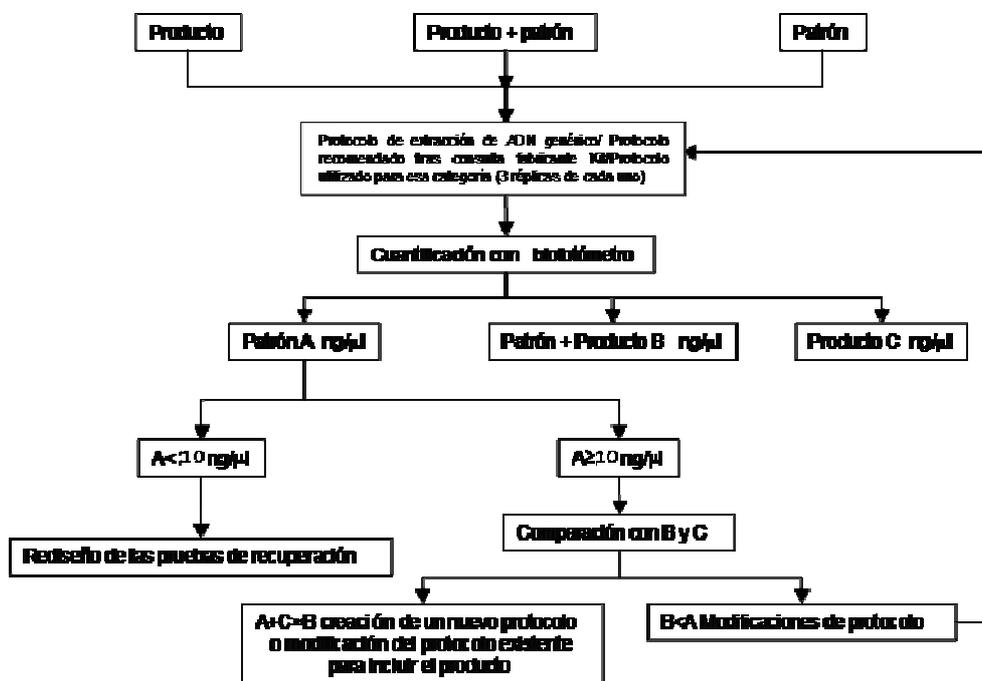


Figura VI.7. Esquema para la validación de las pruebas de recuperación.

Lo importante de estas pruebas es comprobar que se recupera el ADN que se ha añadido previamente, durante la extracción del producto (harina de trigo). Para ello lo que haremos será comparar la cantidad de ADN obtenida en las extracciones del producto con el patrón, frente a la cantidad obtenida en las extracciones del patrón, junto a la cantidad obtenida en las extracciones del producto problema.

La comparación se hace en base a un test de hipótesis. De este modo, si se acepta que las dos medias son iguales ($A+C = B$), la prueba de recuperación ha sido satisfactoria y por tanto podemos concluir que el protocolo aplicado a la muestra es correcto. Si por el contrario se rechaza que las dos medias son iguales, se diseñará un nuevo protocolo para el alimento en cuestión y se repetirá el proceso de validación.

6.5.1. Análisis estadístico aplicado a las pruebas de recuperación

Dadas las matrices problema A, B y C descritas anteriormente, se quiere determinar si la cantidad de ADN proporcionada por la suma de A y C es comparable a la obtenida por B. Con respecto a las varianzas de las distribuciones asumimos el caso más desfavorable, es decir, que la varianza de las tres muestras puede ser distinta. También asumimos que la distribución de las medias muestrales en los tres casos es aproximadamente normal. Nomenclatura para el procedimiento X ($X = A, B$ ó C).

- a) Nomenclatura del procedimiento X ($X = A, B$ ó C), y parámetros estadísticos

Media poblacional (m_X). Varianza poblacional, (σ_X^2)

Tamaño de muestra (n_X). Media muestral, (\bar{X}_X)

Desviación típica muestral (s_X). Varianza muestral, (s_X^2)

- b) Prueba estadística a realizar

Distribución de la suma de las cantidades de ADN obtenidas de las muestras A y C (asumiendo ambos resultados independientes):

$$A + C \sim N(m_A + m_C, \sqrt{\sigma_A^2 + \sigma_C^2})$$

La distribución del ADN obtenida de las muestras por B será:

$$B \sim N(m_B, \sigma_B)$$

Para elucidar la suposición planteada, nos preguntamos si los valores A+C son iguales a B, en promedio. Es decir, se plantea el siguiente test de hipótesis:

$$H_0 : m_A + m_C = m_B$$

$$H_1 : m_A + m_C \neq m_B$$

Que para el supuesto de varianzas desiguales, debe calcularse t_{emp} mediante la siguiente ecuación:

$$t_{emp} = \frac{(\bar{X}_A + \bar{X}_C) - \bar{X}_B}{\sqrt{\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_C^2}{n_C} + \frac{s_B^2}{n_B}}}$$

Obtenido el parámetro t_{emp} , lo comparamos con el obtenido en las tablas de distribución de t con gl grados de libertad (**Figura VI.8**), donde:

		Probabilidad (α)								
		$\alpha=0,0005$	$\alpha=0,001$	$\alpha=0,005$	$\alpha=0,010$	$\alpha=0,025$	$\alpha=0,050$	$\alpha=0,100$	$\alpha=0,200$	$\alpha=0,250$
Grados de libertad	n									
	1	636,578	318,289	63,656	31,821	12,706	6,314	3,078	1,376	1,000
	2	31,600	22,328	9,925	6,965	4,303	2,920	1,886	1,061	0,816
	3	12,924	10,214	5,811	4,541	3,182	2,353	1,638	0,978	0,765
	4	8,610	7,173	4,604	3,747	2,776	2,132	1,533	0,941	0,741
	5	6,869	5,894	4,032	3,365	2,571	2,015	1,476	0,920	0,727
	6	5,959	5,208	3,707	3,143	2,447	1,943	1,440	0,906	0,718
	7	5,408	4,785	3,499	2,988	2,365	1,895	1,415	0,896	0,711
	8	5,041	4,501	3,355	2,896	2,306	1,860	1,397	0,889	0,706
	9	4,781	4,297	3,250	2,821	2,262	1,833	1,383	0,883	0,703
	10	4,587	4,144	3,169	2,761	2,228	1,812	1,372	0,879	0,700
	11	4,137	4,025	3,106	2,718	2,201	1,796	1,363	0,876	0,697
	12	4,318	3,930	3,055	2,681	2,179	1,782	1,356	0,873	0,695
	13	4,221	3,852	3,012	2,650	2,160	1,771	1,350	0,870	0,694
	14	4,140	3,787	2,977	2,624	2,145	1,761	1,345	0,868	0,692
	15	4,073	3,733	2,947	2,602	2,131	1,753	1,341	0,866	0,691
∞	3,290	3,090	2,576	2,326	1,960	1,645	1,282	0,842	0,674	

Figura VI.8. Tablas de distribución de t con gl grados de libertad.

$$gl = \frac{\left(\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_C^2}{n_C} + \frac{s_B^2}{n_B} \right)^2}{\frac{\left(\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_C^2}{n_C} \right)^2}{n_A + n_B - 2} + \frac{\left(\frac{s_B^2}{n_B} \right)^2}{n_B - 1}}$$

Se toma siempre como valor de grados de libertad a buscar en las tablas, el entero más próximo a gl (grado de libertad).

Llamaremos a este valor de tablas $t_{gl}^{\alpha/2}$, donde α es la probabilidad del error de primera especie, fijado habitualmente en el 5% ($\alpha = 0,05$). El valor $t_{gl}^{\alpha/2}$ deja a la derecha un área de valor $\alpha/2$.

En resumen, la decisión a tomar será la siguiente:

$$\begin{array}{ll} \text{Aceptar que } A+C = B & \text{si } |t_{emp}| \leq t_{gl}^{\alpha/2} \\ \text{Rechazar que } A+C = B & \text{si } |t_{emp}| > t_{gl}^{\alpha/2} \end{array}$$

Así, se hicieron pruebas de recuperación para diferentes matrices en las que al cuantificar el ADN se obtuvo un valor inferior a 10 ng/ μ L, o bien no se encontraba en el intervalo de concentraciones aportado por el fabricante para el alimento en cuestión (**Tabla VI.7**), como el caso de sucedáneo de caviar, adquirido en un comercio local y englobado en la categoría 9 del CODEX, para el que se obtuvo en los ensayos de validación una concentración de ADN (2-7 ng/ μ L), inferior a la estipulada en el protocolo del kit (10-200 ng/ μ L). Se procedió a realizar pruebas de recuperación siguiendo el esquema descrito en la **Figura VI.7**, obteniendo los siguientes resultados tras aplicar los criterios estadísticos establecidos.

Concentración de ADN (ng/ μ L) de las muestras y valor medio (3 réplicas):

Muestra A = (10,2; 14,5; 13,2);	Valor medio A = 12,63
Muestra C = (3,2; 2,9; 2,9);	Valor medio C = 3,00
Muestra B = (13,8; 13,4; 14,1);	Valor medio B = 13,77
Varianza muestral:	

Varianza muestral A, $(s_X^2) = 4,86$

Varianza muestral C, $(s_X^2) = 0,03$

Varianza muestral B, $(s_X^2) = 0,123$

Calculamos con los valores anteriores, el valor de t_{emp} aplicando la ecuación descrita anteriormente, obteniendo $t_{emp} = 1,438$; y los grados de libertad $gl = 4,3$, que redondeamos a 4 (número entero más próximo). Así pues, el valor a buscar en tablas es:

$$t_4^{0,025} = 2,776$$

Que cumple el criterio establecido previamente: $|t_{emp}| \leq t_{gl}^{\alpha/2}$; por lo que se acepta que $A+C = B$ y no es preciso modificar el protocolo de análisis.

Si bien en el caso del caviar, encuadrado en la categoría 9, no fue necesario modificar el protocolo de extracción; no ocurrió lo mismo con matrices pertenecientes a otras categorías, ya que en ocasiones no detectábamos ADN por espectrofotometría debido a que o bien su concentración era muy baja o se trataba de matrices muy procesadas. Por ello, al observar diferencias estadísticas tras realizar las pruebas de recuperación, se desarrollaron dos nuevos protocolos para la extracción de ADN partir de alimentos encuadrados en la Categoría 2, grasas y aceites y emulsiones grasas y la Categoría 13 b, lecitinas de soja y suplementos vitamínicos con base de lecitina de soja; incluyendo en adelante en todos los análisis, los correspondientes ensayos de inhibición.

6.5.2. Protocolo de extracción de ADN para alimentos encuadrados en la Categoría 2

Añadir la submuestra al tubo que tiene la solución de lisis. Si el extracto resultante es muy viscoso, de forma que el extracto se mueve con dificultad en el incubador, incrementar el volumen de solución de lisis en $5 \pm 0,01$ mL.

Añadir 20 μ L de Rnasa. Agitar durante $30 \pm 0,1$ segundos con vortex.

Incubar a 65 ± 2 °C durante 30 horas con agitación brusca. Utilizar agitador orbital y estufa.

Centrifugar a 4.600 x rpm, durante 15 minutos $\pm 0,1$ segundos.

Transferir 1 mL de la muestra de la fase acuosa (fase inferior) sobrenadante a un tubo de 2 mL. Realizar el paso anterior con tres tubos y continuar la extracción con los tres. Quitar con la punta de pipeta las gotículas de aceite que puedan pasar.

Añadir 750 μ L de cloroformo estabilizado con etanol. Agitar durante $30 \pm 0,1$ segundos.

Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos $\pm 0,1$ segundos.

Transferir 650 μ L de la fase acuosa (fase superior) a un tubo de 1,5 mL. En este paso aparecerá mucha interfase entre el cloroformo y la fase acuosa, es preferible tomar menos volumen (< 650 μ L), evitando de este modo transferir interfase, pudiendo aparecer color en la disolución final tras resuspender el ADN.

Añadir 390 μ L de isopropanol. Agitar durante $5 \pm 0,1$ segundos e incubar 10 minutos $\pm 0,1$ segundos a temperatura ambiente (o bien 30 minutos $\pm 0,1$ segundos a 5 ± 3 °C en nevera).

Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos $\pm 0,1$ segundos a 4 ± 1 °C.

Eliminar el sobrenadante evitando perder el precipitado.

Añadir 500 μ L de etanol al 70%. Agitar empleando el vortex.

Centrifugar a 13.000 r.p.m, durante 5 minutos $\pm 0,1$ segundos a 4 ± 1 °C.

Eliminar el sobrenadante evitando perder el precipitado.

Resuspender en 25 μ L de agua ultrapura estéril, y unir en un solo tubo teniendo un volumen final (V_f) de 75 μ L.

Conservar el ADN en frigorífico congelador a temperatura entre -15 °C y -20 °C. Si se utiliza en un plazo corto de tiempo (inferior a 5 días), mantener entre 4 y 8 °C en frigorífico congelador.

6.5.3. Protocolo de extracción de ADN para alimentos encuadrados en la Categoría 13b

La lecitina de soja es un derivado de la soja ampliamente utilizado en la elaboración de productos alimenticios, principalmente cárnicos y bollería. Se utiliza como emulgente (E-322). Presenta un alto contenido en fosfolípidos y se

obtiene mediante distintos procesos de refinado a partir de aceite de soja crudo: puede ser sometida a modificación química (acetilada, hidroxilada), granulada, modificada enzimáticamente, etc. Los distintos procesos de transformación hacen que la lecitina de soja presente distintos aspectos (distintos grados de fluidez, tonalidades distintas, etc.), debido a los cambios en su composición (en general, porcentajes de distintos fosfolípidos). Por esta razón, la lecitina de soja comercial se presenta de diversas formas, cada una de las cuales puede contener más o menos ADN en función del procesado al que haya sido sometida.

Si se trata de una muestra líquida, calentar parte de la muestra o la muestra completa a $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 5 minutos $\pm 0,1$ segundos. Normalmente las muestras de lecitina de soja líquida vienen en un recipiente que puede ser expuesto a temperaturas de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras de tipo suplemento vitamínico que vienen en cápsula, deben ser preparadas previamente, sacando el contenido de la cápsula. Medir 10 mL de la muestra vertiéndola directamente a un tubo estéril de 50 mL.

Si se trata de una lecitina granulada, pesar $5 \pm 0,1$ g de la muestra utilizando para ello una hoja de papel de aluminio (autoclavada) y cuchara de plástico desechable. Transferir los $5 \pm 0,1$ g a una bolsa de homogeneización.

Añadir 25 mL de agua ultrapura estéril, 5 mL de NaCl 1,2 M y 20 μL de RNAsa. En el caso de lecitinas granuladas homogeneizar en un homogeneizador masticador y pasar a un tubo de 50 mL

Sellar los tubos con parafilm. Agitar con fuerza hasta que se mezcle completamente la muestra con el agua. Agitar durante 1 minuto $\pm 0,1$ segundos (ayudar con vórtex)

Incubar a $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos $\pm 0,1$ segundos.

Centrifugar a 4.000 r.p.m ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 15 minutos $\pm 0,1$ segundos

Transferir 1,5 mL de la fase acuosa, evitando la fase lipídica superior, a un tubo de 2 mL. Hacerlo con 6 tubos.

Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos $\pm 0,1$ segundos.

Transferir 1 mL de fase acuosa a un tubo de 2 mL

Añadir 750 μL de cloroformo. Agitar 30 segundos.

Centrifugar a 12.000 r.p.m, durante 10 minutos $\pm 0,1$ segundos.

Transferir 300 μL de la fase acuosa de cada tubo a un tubo de 2,0 mL. Se añaden 300 μL de dos tubos por cada tubo de 2 mL (volumen final: 600 μL ; tres tubos).

Añadir 1,2 mL de solución de precipitación. Agitar.

Incubar 1 hora a temperatura ambiente.

Centrifugar a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos \pm 0,1 segundos.

Eliminar el sobrenadante decantando.

Añadir 700 μL de solución salina.

Resuspender el precipitado con vórtex. Dar un spin.

Añadir 700 μL de cloroformo. Agitar 30 segundos.

Centrifugar a 12.000 r.p.m, durante 5 minutos \pm 0,1 segundos.

Transferir 650 μL de la fase acuosa a un tubo de 1,5 mL.

Añadir 390 μL de isopropanol. Agitar.

Incubar 10 minutos \pm 0,1 segundos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 13.500 r.p.m, durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Eliminar el sobrenadante decantando.

Añadir 500 μL de Etanol 70%. Dar vórtex.

Centrifugar a 13.500 r.p.m, durante 5 minutos \pm 0,1 segundos a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Eliminar el sobrenadante decantando.

Secar a vacío.

Resuspender en 20 μL de agua ultrapura estéril.

Unir el ADN de los tres tubos en un solo tubo (volumen final: 60 μL).

Conservar el ADN en frigorífico congelador a temperatura entre $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Si se utiliza en un plazo corto de tiempo (inferior a 5 días), mantener entre $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ en frigorífico congelador.

En general, el rendimiento en la extracción será bajo, ya que se trata de un producto que se obtiene a partir de aceite de soja.

6.5.4. Pruebas de inhibición

Para poder diferenciar entre una posible desviación negativa por presencia de inhibidores en la muestra, o por ausencia de ADN vegetal en el producto, se

realiza en cada ensayo un control de inhibición tal y como se describe en el diagrama de flujo **Figura VI.9**.

El control de inhibición consiste en llevar a cabo una amplificación por PCR® del sistema vegetal en un tubo donde se han mezclado el ADN de la muestra problema con 1 μ L del control de inhibición (harina de trigo). Paralelamente se amplifica otro tubo con 5 μ L de agua y 1 μ L del mismo control de inhibición. Cuando la intensidad de la amplificación de ambas preparaciones es similar indica que no existe inhibición en la muestra.

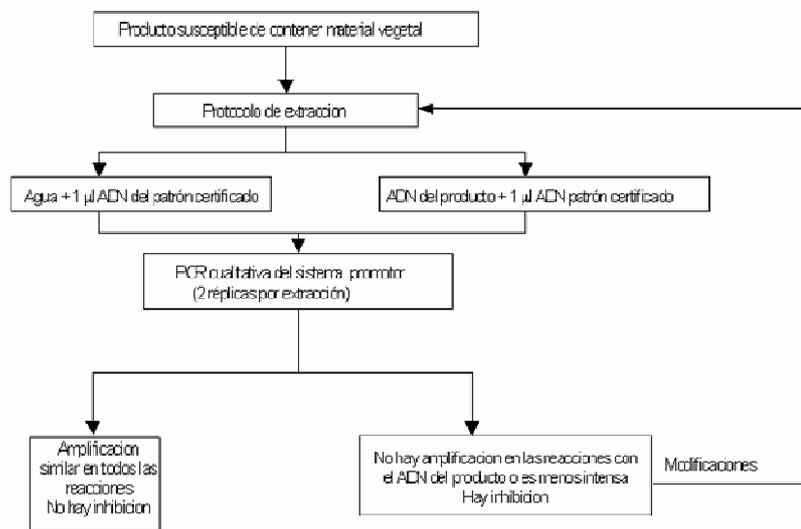


Figura VI.9. Esquema a seguir para realizar las pruebas de inhibición.

En caso contrario, concluiremos que existe inhibición en la muestra, y en consecuencia se modificará el protocolo de extracción hasta obtener un protocolo en el cual no exista inhibición.

En resumen, los resultados de los parámetros de validación y sus respectivos criterios de aceptación y rechazo fueron adecuados y se ajustaron a los criterios establecidos para la estandarización del método de detección de OMGs en alimentos y piensos.

VII - CONCLUSIONES

VII – CONCLUSIONES

Se ha puesto a punto y validado un método de qPCR para la identificación de mamíferos (ternera/cerdo) y aves (pavo/pollo) en alimentos.

Los resultados obtenidos apoyan el empleo de los métodos qPCR para la cuantificación de especies, incluso en productos alimenticios altamente procesados.

El uso de estándares de matriz controlada para obtener información cuantitativa sobre los factores que afectan la producción de qPCR, permite solventar las debilidades asociadas habitualmente a estos métodos para la cuantificación de ADN altamente fragmentado procedente de alimentos sometidos a tratamientos térmicos. Esta aproximación, puede ayudar a mejorar el diseño de métodos robustos para la cuantificación de especies en alimentos procesados.

Se ha puesto a punto un método de PCR que utiliza un mismo juego de cebadores y dos sondas específicas en el mismo vial de reacción, para la detección de mandarina en zumo de naranja, que puede adaptarse fácilmente a otras aplicaciones de alimentos que requieren la diferenciación de especies o cultivos estrechamente relacionados, para los que se dispone de escasa información sobre polimorfismos de secuencia.

Las reacciones de PCR para naranja y mandarina mostraran eficiencias similares, dada la similitud genética entre las secuencias diana, permitiendo la aplicación del método ΔC_{Tc} para llevar a cabo ensayos de *screening*.

Es posible realizar la cuantificación de ambas especies, utilizando una matriz de referencia adaptada para normalizar los resultados, obteniendo así el porcentaje real de ADN diana en la muestra.

La metodología desarrollada es bastante versátil, pudiendo aplicarse a especies para las que existe un gran número de subespecies, variedades o híbridos. En ese caso, el polimorfismo diana seleccionado debe ser validado previamente, secuenciando todas las especies que se espera encontrar en el

producto alimentario, y sólo las variedades validadas podrán incluirse en el alcance del ensayo.

Se ha puesto a punto un procedimiento de análisis para la detección cualitativa de material transgénico (P-35S y T-NOS) por PCR.

El límite de detección del ensayo se estableció en 0,1%, frente a patrones certificados de maíz y soja.

El procedimiento se ha validado en todas las matrices alimentarias y piensos, pudiendo así aplicarse en el análisis de alimentos y piensos que contengan, o sean susceptibles de contener, material vegetal.

VIII – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonina, I., Zivarts, M., Kutyavin, I., Lukhtanov, E., Gamper, H., Meyer, R.B. 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucl Acids Res* 25, 2657-2660.
- Ames, B.N., 1992. Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Ration Read Environ Concerns* 249, 181.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., Van Den Eede, G., 2002. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, 214(1), 3-26.
- Asensio, L., Gonzalez, I, Garcia, T, Martin, R., 2008. Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control* 19, 1-8.
- Asensio, L., 2007. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 558-566.
- Avrameas, S.; Uriel, J., 1966. Méthode de marquage d'antigènes et d'anticops avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C. R. l'Academie des Sciences, Paris*, 262, 2543-2545.
- Ayaz, Y., Ayaz, N.D., Erol, I., 2006. Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay *J Muscle Foods* 17, 214-220.
- Ayyadevara, S., Thaden, J.J., Shmookler Reis, R.J., 2000. Discrimination of Primer 3'-Nucleotide Mismatch by Taq DNA Polymerase during Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem* 284, 11-18.
- Bajla, I., Holländer, I., Fluch, S., Burg, K., Kollár, M., 2005. An alternative method for electrophoretic gel image analysis in the GelMaster software. *Comput Meth Prog Bio* 77, 209-231.
- Ballin, N.Z., Vogensen, F.K., Karlsson, A.H., 2009. Species determination – Can we detect and quantify meat adulteration. *Meat Science*, 83(2), 165-174.
- Bansal, S., Singh, A., Mangal, M., Mangal, A. K., Kumar, S., 2017. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1174-1189.
- Bargar, T.A., Whelan, K.R., Alvarez, D., Echols, K., Peterman, P.H., 2017. Baseline aquatic contamination and endocrine status in a resident fish of Biscayne National Park. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1), 525-533.

- Bayer, R. J., Mabberley, D. J., Morton, C., Miller, C. H., Sharma, I. K., Pfeil, B. E., et al. (2009). A molecular phylogeny of the orange subfamily (Rutaceae:Aurantioideae) using nine cpDNA sequences. *American Journal of Botany*, 96(3), 668–685.
- Bello-Gutiérrez, J., 2012. Calidad de vida, Alimentos y Salud Humana: Fundamentos científicos, 394 p.
- Bergerová E, Hrnčířová Z, Stankovská M, Lopasovská, M, Siekel, P. 2010. Effect of Thermal Treatment on the Amplification and Quantification of Transgenic and Non-transgenic Soybean and Maize DNA. *Food Anal Methods* 3, 211-218.
- Betina, V., 1989. Mycotoxins. Chemical, Biological and Environmental Aspects. Ed. Elsevier. Bratislava, 350 p.
- Boletín Oficial del Estado, 1999. Real Decreto 1334/1999, de 31 de Julio, por el que se aprueba la Norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios. 24.08.1999, Vol 202 pp. 31402-31418.
- Boletín Oficial del Estado, 2004. Real Decreto 2220/2004, de 26 de noviembre, por el que se modifica la norma general de etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios, aprobada por el Real Decreto 1334/1999, de 31 de julio. 27.11.2004, Vol 286 pp. 39355-39357.
- Bottero MT, Dalmaso A, Cappelletti M, Secchi C, Civera T. 2007. Differentiation of five tuna species by a multiplex primer-extension assay. *J Biotechnol* 129, 575-580.
- Bradley, R. 2003. BSE risks for humans consuming beef and beef products: How are risks managed. *Vet Res Comm*, 27, 15-23.
- Brodmann, P.D., Moor, D., 2003. Sensitive and semi-quantitative TaqMan™ real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. *Meat Sci* 65, 599-607.
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., Morisset, D., 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 115-126.
- Brown, W.M., George, M.Jr., Wilson, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci* 76, 1967-1971.

- Buiting, A.M.J.; Van Rooijen, N.; Claassen, E., 1992. Liposomes as antigen carrier and adjuvants in vivo. *Research Immunology*, 143, (5), 541-548.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaff, M.W., 2005. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.
- Calvo, J. H., Osta, R., Zaragoza, P. 2002. Species-specific amplification for detection of bovine, ovine and caprine cheese. *Milchwissenschaft*, 57, 444-446.
- Carrera, E., García, T., Céspedes, A., González, I., Fernández, A., Asensio, L.M., Hernández, P.E., Martín, R., 2000. Identification of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR-restriction fragment length polymorphism of the p53 gene. *J AOAC Int* 83, 341346.
- Cattori, V., Hofmann-Lehmann, R., 2008. Absolute quantitation of feline leukemivirus proviral DNA and viral RNA loads by TaqMan real-time PCR and RT-PCR. *Methods Mol Biol* 429, 73-87.
- Cimino, A.M., Boyles, A.L., Thayer, K.A., Perry, M.J., 2017. Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 125(2), 155.
- Clegg, R.M., 1995. Fluorescence resonance energy transfer. *Curr Opin Biotech* 6, 103-110.
- Comisión Europea. 2006a. Reglamento de la comisión 1881/2006 de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L364/5.
- Comisión Europea. 2006b. Recomendación de la comisión de 17 de agosto de 2006 sobre la prevención y la reducción de las toxinas de *Fusarium* en los cereales y los productos a base de cereales (2006/583/CE).
- Corti J., 2010. Organismos genéticamente modificados y riesgos sanitarios y medioambientales: derecho de la Unión Europea y de la Organización Mundial del Comercio. Madrid: Ediciones Reus, p. 11.
- Cumbre Mundial sobre la Alimentación, 1996. Plan de Acción de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación, 13-17 de noviembre de 1996, FAO, Roma.
- Cunningham, E.P., Meghen, C.M., 2001. Biological identification systems: genetic markers. *Rev Sci Tech OIE* 20, 491-499.

- Dalmaso, A., Fontanella, E., Piatti, P., Civera, T., Rosati, S., Bottero, M.T. 2004. A multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes* 18, 81-87.
- Daniell, H., Kumar, S., Dufourmantel, N., 2005. Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops. *Trends in Biotechnology*, 23(5), 238-245.
- de Araujo, E. F., de Queiroz, L. P., & Machado, M. A. (2003). What is citrus? Taxonomic implications from a study of cp-DNA evolution in the tribe Citreae (Rutaceae subfamily Aurantioideae). *Organisms Diversity & Evolution*, 3(1), 55–62.
- Decisión de la Comisión 96/281/CE, relativa a la comercialización de semillas de soja (*Glycinemax* L.) modificada genéticamente con una mayor resistencia al herbicida glifosato, de conformidad con la Directiva 90/220/CEE. DOCE L 107 30.04.1996.
- Decisión de la Comisión 97/98/CE relativa a la comercialización de maíz (*Zea mays*) modificado genéticamente con una alteración de las propiedades insecticidas conferidas por el gen de la endotoxina Bt de conformidad con la Directiva 90/220/CEE. DOCE L 031 01.02.1997.
- Degnan, F.H., 2007. *Biotechnology and the food label*. Oxford University Press: New York. pp. 17-32.
- del Castillo, M. L. R., Caja, M. M., Herraiz, M. 2003. Use of the enantiomeric composition for the assessment of the authenticity of fruit beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1284–1288.
- Devos, Y., Guajardo, I.M., Glanville, J., Waigmann, E., 2017. Explanatory note on literature searching conducted in the context of GMO applications for (renewed) market authorisation and annual post-market environmental monitoring reports on GMOs authorised in the EU market. *EFSA Supporting Publications*, 14(4).
- Dhanasekaran, S., Doherty, T.M., Kenneth, J., 2010. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods* 354,34-39.
- Di Pinto, A., Alfano, F., Giordano, A., Capuano, F., Valentina, T., and Tantillo, G., 2008. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the presence of

- genetically modified maize in breaded "ready-to-cook" food products. *Food Control* 19, 1002-1005.
- Díaz Granados, C., Chaparro-Giraldo, A., 2012. Plant genetic transformation methods. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*, 15(1), 49-61.
- Directiva 2001/18/EC sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente. DOCE L 106 17.04.2001.
- Directiva 90/220/EEC sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente. DOCE L 117 08.05.1990.
- Dooley, J.J., Paine, K.E., Garret, S.D., and Brown, H.M., 2004. Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Sci* 68, 431-438.
- Ducauze, C.J., 2006. Fraudes alimentarios: Legislación y metodología analítica.
- Eckert, K.A., Kunkel, T.A., 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl Acids Res* 18, 3739-3744.
- Edwards, M.C., Gibbs, R.A., 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl* 3, S65-75.
- Elizaquível, P., Gabaldón, J. A., Aznar, R., 2011. Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. *Food Control*, 22(2), 158-164.
- Elizaquível, P., Sánchez, G., Aznar, R., 2012. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidiummonoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25(2), 704-708.
- Enger, O., 1996. Use of the fluorescent dye PicoGreen for quantification of PCR products after agarose gel electrophoresis. *Biotechniques* 21, 372-374.
- Engvall, E., Perlmann, P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874.
- Ercegovich, C.D., 1971. Analysis of pesticide residues. *Immunological techniques*. En: *Pesticide Identification at the Residue Level*, F.J. Biros (Ed.), American Chemical Society, Washington, DC, pp. 162-177.
- Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M.G., 1997. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nature biotechnology*, 15(2), 137-141.

- Esturo, A., 2008. Results EQCS orange juice campaign 2007. In European Quality Control System for Juices and Nectars from Fruits and Vegetables Workshop (Frankfurt, Germany).
- Eugster A, Ruf J, Rentsch J, Hubner P, Koppel, R. 2008. Quantification of beef and pork fraction in sausages by real-time PCR analysis: results of an interlaboratory trial. *Europ Food Res Technol* 227, 17-20.
- Eugster, A., Ruf, J., Rentsch, J., Koppel, R., 2009. Quantification of beef, pork, chicken and turkey proportions in sausages: use of matrix-adapted standards and comparison of single versus multiplex PCR in an interlaboratory trial. *Eur Food Res Technol* 230, 55-61.
- European Commission, 2002. Commission decision of 27 March 2002 amending council decision 2007/766/EC and commission decision 2001/9/EC with regard to transmissible spongiform encephalopathies and the feeding of animal proteins. 2002/248/EC, Official Journal of the European Communities, Vol L84 pp. 71-72.
- European Commission, 2004. Commission Recommendation of 4 October 2004 on technical guidance for sampling and detection of genetically modified organisms and material produced from genetically modified organisms as or in products in the context of Regulation (EC) No 1830/2003. 2004/787/EC, Official Journal of the European Union, 24.11.2004, Vol L348 pp. 18-26.
- European Commission, 2015. Fact Sheet: Questions and Answers on EU's policies on GMOs. Disponible en: [http://europa.eu/rapid/press-release MEMO-15-4778 en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-15-4778_en.htm).
- European Council, 2001. Council Directive 2001/112/EC of 20 December 2001 relating to fruit juices and certain similar products intended for human consumption. Vol. 2001/112/EC. Official Journal of the European Communities.
- European Council, 2000. Directive of the European parliament and of the council of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. 2000/13/EC Official Journal of the European Communities, 06.05.2000, Vol L109 pp. 29-42.

- European Council, 2002. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. 178/2002 Official Journal of the European Communities, 01.02.2002, Vol L31 pp. 1-24.
- Everstine, K., Spink, J., Kennedy, S., 2013. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *Journal of Food Protection*, 76(4), 723-735.
- FAO y OMS, 1999. Qué es el Codex Alimentarius. División: Dirección de Nutrición. ISSN: 1020-2579. Disponible en: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y7867s/y7867s00.pdf>.
- Ferre, F., 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR MethodsAppl* 2, 1-9.
- Flores-Munguía, M.E., Bermúdez-Almada, M.C., Vázquez-Moreno, L., 2000. A research note: Detection of adulteration in processed traditional meat products. *J Muscle Foods* 11, 319-325.
- Frezza, D., Favaro, M., Vaccari, G., von-Holst, C., Giambra, V., Anklam, E., Bove, D., Battaglia, P.A., Agrimi, U., Brambilla, G., 2003. A competitive polymerase chain reaction-based approach for the identification and semiquantification of mitochondrial DNA in differently heat-treated bovine meat and bone meal. *J Food Protect* 66, 103-109.
- Frezza, D., Giambra, V., Chegiani, F., Fontana, C., Maccabiani, G., Losio, N., Faggionato, E., Chiappini, B., Vaccari, G., von Holst, C., 2008. Standard and Light-Cycler PCR methods for animal DNA species detection in animal feedstuffs. *Innov Food SciEmerg* 9, 18-23.
- Fukal, L., Kas, J., 1989. The advantages of immunoassay in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 8(3), 112-116.
- Fumiere O, Dubois M, Baeten V, von Holst C, Berben G. 2006. Effective PCRdetection of animal species in highly processed animal byproducts and compoundfeeds. *Anal Bioanal Chem* 385, 1045-1054.
- Gabaldon JA, Maquieira A, Puchades R. 2007. Development of a simpleextraction procedure for chlorpyrifos determination in food samples by immunoassay. *Talanta* 71, 1001-1010.

- García-Olmedo, F., 2009. El ingenio y el hambre: de la revolución agrícola a la transgénica, 288p.
- García-Segura, J.M., Gavilanes, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez-Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M., Ivanco, F., 1996. Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica. Madrid, Editorial Síntesis.
- Georgiou, C.A., Danezis, G.P., 2017. Food Authentication: Management, Analysis and Regulation. John Wiley & Sons.
- Ghovvati, S., Nassiri, M.R., Mirhoseini, S.Z., Moussavi, A.H., Javadmanesh, A., 2009. Fraud identification in industrial meat products by multiplex PCR assay. *Food Control* 20, 696-699.
- Gibson, N.J. 2006. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clinica Chimica Acta*, 363(1-2), 32-47.
- Giovannacci, I., Guizard, C., Carlier, M., Duval, V., Martin, J.L., Demeulemester, C., 2004. Species identification of meat products by ELISA. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(8), 863-867.
- Gongora, J., Fleming, P., Spencer, P.B.S., Mason, R., Garkavenko, O., Meyer, J.-N., Droegemueller, C., Lee, J.H., Moran, C., 2004. Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand feral pigs assessed by mitochondrial control region sequence and nuclear GPII genotype. *Mol Phylogenet Evol* 33, 339-348.
- González, F.J.G., 2012. Jenofonte: Anábasis IV. Universidad Almería.
- González, I., Carrera, E., Fernández, A., Hernández, P.E., García, M.T., Martín, R., Asensio, L., and Céspedes, A., 2000. Identificación de salmón, trucha y palometa ahumados: técnicas analíticas de interés. *Alimentación, Equipos y Tecnología* 5, 123-136.
- Grojtan, H.E.; Keel, B.A., 1996. Data interpretation and quality control. En: *Immunoassay*. E.P. Diamandis; T.K. Christopoulos (Eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp. 51-93.
- Grosso, M., Pirani, J. R., Salatino, M. L. F., Blanco, S. R., & Kallunki, J. A. (2008). Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany*, 95(8), 985-1005.
- Gustafson, J.P., 1976. The Evolutionary Development of Triticale: The Wheat Rye Hybrid. In *Evolutionary Biology* (pp. 107-135). Springer US.
- Hage, D.S., 1995. Immunoassays. *Anal.Chem.* 67 (12), 455R-462R.

- Hammock, B.D.; Mumma, R.O., 1980. Potential of immunochemical technology for pesticide analysis. En: *Recent Advances in Pesticide Analytical Technology*. J.R.J. Harvey; G. Zweig (Eds.), ACS Symposium Series 136, American Chemical Society, Washington, DC, 321 pp.
- Hammond, D.A. 2001. Synergy between liquid chromatographic-pulsed amperometric detection and capillary-gas chromatographic methods for the detection of juice adulteration. *Journal of Aoac International*, 84(3), 964–975.
- Han, J., Wu, Y., Huang, W., Wang, B., Sun, C., Ge, Y., et al. (2012). PCR and DHPLC methods used to detect juice ingredient from 7 fruits. *Food Control*, 25(2), 696–703.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 968-994.
- Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., Pla, M., 2003. Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Anal Biochem* 323,164-170.
- Hernández-Rodríguez, M., Gallego, S., 1999. *Tratado de Nutrición*. Ediciones Díaz de Santos. SA Madrid (España).
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real time monitoring DNA amplification reactions. *Biotechnol* 11, 1026-1030.
- Hird H, Chisholm J, Sanchez A, Hernandez M, Goodier R, Schneede K, Boltz C, Popping B. 2006. Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food Addit Contam* 23, 645-650.
- Hock, B.; Dankwardt, A.; Kramer, K.; Marx, A., 1995b. Immunochemical techniques: antibody production for pesticide analysis. A review. *Anal. Chim. Acta*, 311, 393-406.
- Hock, B.; Giersch, T.; Kramer, K.; Dankwardt, A., 1995a. Antibody production and progress in hybridoma technology by immunomagnetic screening. En: *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*. D.A. Kurtz; J.H. Skerritt; L. Stanker (Eds.), AOAC International, Arlington, VA, pp. 149-162.

- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* 88, 7276-7280.
- Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., Wulff, D., 2012. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1318-1335.
- Hsieh, Y.H.P., Woodward, B.B., Ho, S.H., 1995. Detection of species substitution in raw and cooked meats using immunoassays. *J Food Protect* 58, 555-559.
- IARC.1993. Centro Internacional para Investigaciones sobre el Cáncer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 56: Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Ed. IARC, Lyon, 1993 International Agency for Research on Cancer, (IARC) Lyon, France.
- Informe 04|2016, 2017. Nuevos hábitos de consumo, cambios sociales y tecnológicos. Consejo Económico y Social España, 90 p.
- Ingallinera, B., Barbagallo, R. N., Spagna, G., Palmeri, R., & Todaro, A. 2005. Effects of thermal treatments on pectin esterase activity determined in blood oranges juices. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(2-3), 258-263.
- Innis, M., Gelfand, D., Michael, A.I., David, H.G., John, J.S., 1999. Optimization of PCR: Conversations between Michael and David. In *PCR Applications* San Diego, Academic Press, pp. 3-22.
- Intrieri, M. C., Muleo, R., Buiatti, M. 2007. Chloroplast DNA polymorphisms as molecular markers to identify cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82(1), 109-113.
- Jackson, C.O, 2015. Food and drug legislation in the New Deal. Princeton University Press.
- James, C., 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.
- Josefsen, M.H., Löfström, C., Sommer, H.M., Hoorfar, J., 2009. Diagnostic PCR: Comparative sensitivity of four probe chemistries. *Mol Cell Probes* 23, 201-203.

- Kennedy, S., Oswald, N., 2011. PCR troubleshooting and optimization: the essential guide. Horizon Scientific Press (Eds.).
- Kingcombe CIB, Luthi E, Schlosser H, Howald D, Kuhn M Jemmi T. 2001. A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions of animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Sci* 57, 35-41.
- Kingcombe, C.I.B., Luthi, E., Schlosser, H., Howald, D., Kuhn, M., Jemmi, T., 2001. A PCR-based test for species-specific determination of heat treatment conditions for animal meals as an effective prophylactic method for bovine spongiform encephalopathy. *Meat Sci* 57, 35-41.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl AcadSci* 86, 6196-6200.
- Kocher, T.D., Wilson, A.C., 1991. DNA amplification by the polimerase chain reaction. In *Essential Molecular Biology* vol 2, T.A. Brown, ed., Oxford University Press, pp. 187-209.
- Köppel R, Zimmerli F, Breitenmoser A. 2009. Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *Eur Food Res Technol* 230, 125-133.
- Köppel, R., Ruf, J., Zimmerli, F., Breitenmoser, A., 2008. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. *Eur Food Res Technol* 227, 1199-1203.
- Kuchmenko, T.A., Lisitskaya, R.P., Bobrova, O.S. 2008. Test method for detecting adulterated apple juice using piezoelectric resonators. *Journal of Analytical Chemistry*, 63(6), 596–602.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, Gorn VV, Lukhtanov EA, Belousov ES, Singer MJ, Walburger DK, Lokhov SG, Gall AA, Dempcy R, Reed MW, Meyer RB Hedgpeth, J. 2000. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucl Acids Res* 28, 655-661.
- Kwok, S., Kellog, D.E., Spasic, D., Goda, L., Levenson, C., Sninsky, J.J., 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl Acids Res* 18, 999-1005.

- Lafuente, G.S. 2009. Mercados de trabajo y emigración en los planes de desarrollo. Entre el Mercado y el Estado. Los planes de desarrollo durante el franquismo, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, 147-176.
- Laube I, Spiegelberg A, Butschke A, Zagon J, Shauzu M, Kroh L, Broll H. 2003. Methods for the detection of beef and pork in foods using real time polymerase reaction. *Int J Food Sci Technol* 38, 111-118.
- Laube I, Zagon J, Broll H. 2007. Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *International Journal of Food Science and Technology* 42, 336-341.
- Laube, I., Hird, H., Brodmann, P., Ullmann, S., Schoene-Michling, M., Chisholm, J., 2010. Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. *Food Chemistry*, 118(4), 979–986.
- Le Bars, J.; Le Bars, P. 1998. Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing. *Revue de Medecine Veterinaire-Toulouse* 149, 493-500.
- Levidow, L., Boschert, K., 2008. Coexistence or contradiction. GM crops versus alternative agricultures in Europe. *Geoforum* 39, 174-190.
- Li, Y., Cheng, Y., Yi, H.L., Deng, X. 2006. Genetic diversity in mandarin landraces and wild mandarins from China based on nuclear and chloroplast simple sequence repeat markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 81(3), 371–378.
- Li, Y., Cheng, Y., Tao, N., Deng, X. 2007. Phylogenetic analysis of mandarin landraces, wild mandarins, and related species in China using nuclear LEAFY second intron and plastid trnL–trnF sequence. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(6), 796–806.
- Ling, L.L., Keohavong, P., Dias, C., Thilly, W.G., 1991. Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. *PCR Methods Appl* 1, 63-69.
- Lipp, M., Anklam, E., Stave, J.W., 2000. Validation of an immunoassay for detection and quantification of a genetically modified soybean in food and food fractions using reference materials: Interlaboratory study. *J. AOAC Int.*, 83: 919-927.
- Lockley, A.K., Bardsley, R.G., 2000a. DNA-based methods for food authentication. *Trends Food Sci Technol* 11, 67-77.

- Lockley, A.K., Bardsley, R.G., 2000b. Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. *J Agric Food Chem* 48, 4463-4468.
- Long, G. L., Winefordner, J. D. 1983. Limit of detection: A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, 55(7), 712A-724A.
- López, I., Pardo, M.A. 2005. Application of relative quantification TaqMan real time polymerase chain reaction technology for the identification and quantification of *Thunnus alalunga* and *Thunnus albacares*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4554-4560.
- López-Andreo M, Garrido-Pertierra A, Puyet A. 2006. Evaluation of post-PCR melting temperature analysis for meat Species identification: fish in mixed DNA samples. *J Agric Food Chem* 54, 7973-7978.
- López-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto MI, Puyet A. 2005. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 339, 73-82.
- López-Andreo, M., Aldeguer, M., Guillén, I., Gabaldón, J. A., Puyet, A. 2012. Detection and quantitation of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA. *Food Chemistry*, 134(1), 518-523.
- Mackie, I.M., Pryde, S.E., Gonzales-Sotelo, C., Medina, I., Perez-Martín, R., Quinteiro, J., Rey-Mendez, M., Rehbein, H., 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci Technol* 10, 9-14.
- Marasas, W.F.O, Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., Thiel, P.G. y Van der Lugt, J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55, 197-203.
- Marder, E. P., 2017. Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance—Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 2013–2016. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 66.
- Marmioli, N., Maestri, E., Gulli, M., Malcevschi, A., Peano, C., Bordoni, R., 2008. Methods for detection of GMOs in food and feed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(3), 369-384.

- Matsunaga, I., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., and Shimura, Y., 1999. A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci* 51, 143-148.
- Maudet, C., and Taberlet, P., 2002. Holstein's Milk Detection in Cheeses Inferred from Melanocortin Receptor 1 (MC1R) Gene Polymorphism. *Journal of Dairy Science* 85, 707-715.
- Mazur, M., Sieradzki, Z., Król, B., Kwiatek, K., 2017. Multiplex PCR assays for qualitative detection and identification of the GT73, Ms8, Rf3 and T45 varieties of genetically modified oilseed rape. *J. Anim. Feed Sci* 26(2), 148-156.
- Mazzetti, M., Fascioli, R., Mazzoncini, I., Spinelli, G., Morelli, I., Bertoli, A., 2004. Determination of 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) in chilli powder and in chilli-containing food products by GPC clean-up and HPLC with LC/MS confirmation. *Food additives and contaminants* 21(10), 935-941.
- Mello, E., Lusuardi, S., Meloni, S., Oddone, M., 1982. Provenance studies of Roman amphorae by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 69(1), 259-270.
- Mendoza-Romero, L., Verkaar, E.L.C., Savelkoul, P.H., Catsburg, A., Aarts, H.J.M., Buntjer, J.B., Lenstra, J.A., 2004. Real-time PCR detection of ruminant DNA. *J Food Protect* 67, 550-554.
- Merrill, R.A., 1988. FDA's implementation of the Delaney Clause: Repudiation of congressional choice or reasoned adaptation to scientific progress. *Yale J. on Reg.*, 5, 1.
- Meyer, R., Candrian, U., and Lüthy, J., 1994. Detection of pork in heated meat products by polymerase chain reaction (PCR). *J AOAC Int* 77, 617-622.
- Michelini, E., Simoni, P., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Roda, A., 2008. New trends in bioanalytical tools for the detection of genetically modified organisms: an update. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392(3), 355-367.
- Miller, J.D., 1995. Fungi and Mycotoxins in Grain: Implications for Stored Product Research. *Journal of Stored Products Research* 31(1), 1-16.
- Miraglia, M., Berdal, K.G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E.J., Marvin, H.J.P., Schimmel, H., Rentsch, J., van Rie, J., 2004. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1157-1180.

- Mooney, R., Chappell, L., Knight, A.I. 2006. Evaluation of a polymerase chain reaction-based heteroduplex assay for detecting the adulteration of processed orange juice with mandarin juice. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1052–1060.
- Moore, J.C., Spink, J., Lipp, M., 2012. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science* 77(4).
- Moss, M.O, 1996. Mycotoxins. Centenary review. *Mycological Research* 5, 513-523.
- Mullis, K. B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262(4), 56-61.
- Myers, T.W., Gelfand, D.H., 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry-US* 30, 7661-7666.
- Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Schmidt, C., Meldrup, D., Gronkjaer, P., 2001. Fisheries- Population of origin of Atlantic cod. *Nature* 413, 272-272.
- Olmedo, F.G. 2004. Ortorexia: La obsesión por los alimentos naturales. *Opinión*.
- Palisch A, Mergemeier S, Kuhn M. 2003. A real-time PCR system for the relative quantitation of beef and pork contents in meat containing food. *Fleischwirtschaft* 83, 153-156.
- Park, J.W., and Crowley, D.E., 2005. Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification of target genes by real-time PCR and DGGE. *Biotechniques* 38, 579-586.
- Parlamento europeo, 2009-2014. Opinión de la Comisión de Agricultura y Desarrollo Rural para la Comisión de Medio Ambiente, Salud Pública y Seguridad alimentaria informe sobre la crisis alimentaria, los fraudes en la cadena alimentaria y el control correspondiente(2013/2091(INI)).
- Pearsall, D., 2016. GM Crop Coexistence in Practice: Delivering Real Choices for Farmers and Consumers. *EuroChoices*, 15(1), 12-16.
- Pfaffl, M.W., 2008. Gene-quantification info. <http://www.gene-quantification.de/>.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D., 1997. *Fungi and food spoilage*, 2^a Ed. Chapman and Hall, Londres.
- Porstmann, T.; Kiessig, S.T., 1992. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J. Immunol. Methods*, 150, 5-21.

- Prado M, Berben G, Fumiere O, van Duijn G, Mensinga-Kruize J, Reaney S, Boix A, von Holst C. 2007. Detection of ruminant meat and bone meals in animal feed by real-time polymerase chain reaction: Result of an interlaboratory study. *J AgricFood Chem* 55, 7495-7501.
- Prado, M., Casqueiro, J., Iglesias, Y., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., 2004. Application of a polymerase chain reaction (PCR) method as a complementary tool to microscopic analysis for the detection of bones and other animal tissues in home made animal meals. *J Sci Food Agr* 84, 505-512.
- Puyet, A., Bautista, J.M., 2009. Detection of adulterations: Identification of seafood species. In *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*, L.M.L. Nollet, and F. Toldrá, eds. Boca Raton, CRC Press, pp. 687-712.
- Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H., Pryde, S.E., Medina, I., Perez-Martin, R.I., Rey-Mendez, M., Mackie, I.M. 1998. Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in Species Identification of Canned Tuna. *J Agric Food Chem* 46, 1662-1669.
- Raeymaekers, L., 1993. Quantitative PCR: Theoretical Considerations with Practical Implications. *Anal Biochem* 214, 582-585.
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), 2015. Directorate general for health and consumer protection, European Commission, Brussels.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB journal* 22, 659-661.
- Reglamento (CE) 1139/98 relativo a la indicación obligatoria en el etiquetado de determinados productos alimenticios fabricados a partir de organismos modificados genéticamente. DOCE L 6 26.05.1998.
- Reglamento (CE) 1829/2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. DOCE L 268/1 18.10.2003.
- Reglamento (CE) 258/97 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. DOCE L 043 14.02.1997.
- Reglamento (CE) 49/2000 por el que se modifica el Reglamento (CE) 1139/98, relativo a la indicación obligatoria en el etiquetado de determinados productos alimenticios fabricados a partir de organismos modificados genéticamente. DOCE L 6 11.01.2000.

- Reglamento (CE) 50/2000 relativo al etiquetado de los productos alimenticios e ingredientes alimentarios que contienen aditivos y aromas modificados genéticamente o producidos a partir de organismos modificados genéticamente. DOCE L 6 11.01.2000.
- Rennie, C., Noyes, H.A., Kemp, S.J., Hulme, H., Brass, A., Hoyle, D.C., 2008. Strong position-dependent effects of sequence mismatches on signal ratios measured using long oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics* 9, 317.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245, 154-160.
- Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Fernández A, Lobo E, Hernández PE, Martín R. 2001. Identification of goose (*Anser anser*) and mule duck (*Anas platyrhynchos* x *Cairina moschata*) foie gras by multiplex polymerase chain reaction amplification of the 5S rDNA gene. *J Agric Food Chem* 49, 2717-2721.
- Rodríguez MA, García T, González I, Asensio L, Hernández PE, Martín R. 2004. Quantitation of mule duck in goose foie gras using TaqMan real-time polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* 52, 1478-1483.
- Rodríguez, M.A., García, T., González, I., Hernández, P.E., Martín, R., 2005. TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Sci* 70(1), 113-120.
- Ronquillo, M.G., Hernández, J.C.A., 2017. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. *Food Control*, 72, 255-267.
- Ros-Chumillas, M., Belissario, Y., Iguaz, A., Lopez, A. 2007. Quality and shelf life of orange juice aseptically packaged in PET bottles. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 234-242.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., McDowell, D., 2003. Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control* 14, 579-583.

- Scott, M., Knight, A. 2009. Quantitative PCR analysis for fruit juice authentication using PCR and laboratory-on-a-chip capillary electrophoresis according to the Hardy-Weinberg Law. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4545–4551.
- Sebastian-Ponce, M.I., Sanz-Valero, J., Wanden-Berghe, C., 2014. Los usuarios ante los alimentos genéticamente modificados y su información en el etiquetado. *Revista de Saúde Pública*, 48(1), 154-169.
- Shah, D.M., Horsch, R.B., Klee, H.J., Kishore, G.M., Winter, J.A., Tumer, N.E., Siegel, N. R., 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*, 233(4762), 478-481.
- She, X., Rohl, C.A., Castle, J.C., Kulkarni, A.V., Johnson, J.M., Chen, R., 2009. Definition, conservation and epigenetics of housekeeping and tissue-enriched genes. *BMC Genomics* 10, 269.
- Souaze, F., Ntodou-Thome, A., Tran, C.Y., Rostene, W., Forgez, P., 1996. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 21, 280-285.
- Stadhouders, R., Pas, S.D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T.H., Schutten, M., 2009. The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *J Molec Diagn* 12, 109-117.
- Szurdoki, F.; Bekheit, H.K.M.; Marco, M.P.; Goodrow, M.H.; Hammock, B.D., 1995. Important factors in hapten design and enzyme-linked immunosorbent assay development. En: *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*. D.A. Kurtz; J.H. Skerritt; L. Stanker (Eds.), AOAC International, Arlington, VA, pp. 39-63.
- Tabuenca, J.M, 1981. Toxic-allergic syndrome caused by ingestion of rapeseed oil denatured with aniline. *The Lancet*, 318(8246), 567-568.
- Teletchea, F., Maudet, C., Hänni, C., 2005. Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends Biotechnol* 23, 359-366.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E., 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 75, 291-295.
- Tijssen, P., 1987. Practice and theory of enzyme immunoassays. En: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. R.H. Burdon; P.H. van Knippenberg (Eds.), Elsevier, Amsterdam, vol. 15.

- Tindall, K.R., and Kunkel, T.A., 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry-US* 27, 6008-6013.
- Trotta, M., Schönhuth, S., Pepe, T., Cortesi, M.L., Puyet, A., Bautista, J.M., 2005. Multiplex PCR method for use in real-time PCR for identification of fish fillets from grouper (*Epinephelus* and *Mycteroperca* species) and common substitute species. *J Agric Food Chem* 53, 2039-2045.
- US Food and Drug Administration (2011). Inspections, Compliance, Enforcement, and Criminal Investigations. Miscellaneous food products. Vol. 2, [section 10].
- van Hengel, A. J., 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(1), 111-118.
- Vardin, H., Tay, A., Ozen, B., Mauer, L. 2008. Authentication of pomegranate juice concentrate using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*, 108(2), 742-748.
- Vet, J.A., Marras, S.A., 2005. Design and optimization of molecular beacon real-time polymerase chain reaction assays. *Methods Mol Biol* 288, 273-290.
- Walker, J.A., Hughes, D.A., Anders, B.A., Shewale, J., Sinha, S.K., Batzer, M.A., 2003. Quantitative intra-short interspersed element PCR for species-specific DNA identification. *Anal Biochem* 316, 259-269.
- Walker, J.A., Hughes, D.A., Hedjes, D.J., Anders, B.A., Laborde, M.E., Shewale, J., Sinha, S.K., Batzer, M.A., 2004. Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. *Genomics* 83, 518-527.
- Weibin, B., Wentao, X., Kunlun, H., Yanfang, Y., Sishuo, C., Yunbo, L., 2009. A novel common primer multiplex PCR (CP-M-PCR) method for the simultaneous detection of meat species. *Food Control* 20, 366-370.
- Weiss, J., Ros-Churnillas, M., Pena, L., Egea-Cortines, M. 2007. Effect of storage and processing on plasmid, yeast and plant genomic DNA stability in juice from genetically modified oranges. *Journal of Biotechnology*, 128(1), 194-203.
- Wilhelm, J., Pingoud, A., Hahn, M., 2003. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucl Acids Res* 31, e56.

- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, R.P., 1997a. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22, 134-138.
- Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Goudry, R.A., Balis, U., 1997b. The Light Cycler: a microvolumemultisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22, 176-181.
- Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75-85.
- Yalow, R.S.; Berson, S.A. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184, 1648-1649.
- Yilmaz, A.B., Yanar, A., Alkan, E.N., 2017. Review of heavy metal accumulation on aquatic environment in Northern East Mediterranean Sea part I: some essential metals. *Reviews on Environmental Health* 32(1-2), 119-163.
- Yim, H.; Kibbey, C.E.; Ma, S.; Kliza, D.M.; Liu, D.; Park, S.; Espadas-Torre, C.; Meyerhoff, M.E., 1993. Polymer membrane-based ion-, gas- and bio-selective potentiometric sensors. *Biosensors Bioelectronics* 8 (1), 1-38.
- Zha, D., Xing, X., Yang, F., 2010. A multiplex PCR assay for fraud identification of deer products. *Food Control* 21, 1402-1407.
- Zhang, C.L., Fowler, M.R., Scott, N.W., Lawson, G., Slater, A., 2007a. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control* 18, 1149-1158.
- Zhang, J.B., Wang, H.J., Cai, Z.P., 2007b. The application of DGGE and AFLP derived SCAR for discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Control* 18, 672-676.
- Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., Arnheim, N., 1992. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5847-5851.
- Zhang, L., Wu, L.L., Wang, Y. P., Liu, A.M., Zou, C.C., Zhao, Z.Y., 2009. Melamine-contaminated milk products induced urinary tract calculi in children. *World Journal of Pediatrics*, 5(1), 31-35.
- Zúñiga-Quiñónez, S., Urista-Vidrio, M.C., Ruiz-Sandoval, J.L., 2002. Enfermedad de Creutzfeldt Jacob. Del kuru a las vacas locas. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 3(1), 13-19.

