



Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y
BIOCIENCIAS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA BIOZIENTZIETAKO GOI
MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA***

*PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO BASADO EN PCR A TIEMPO REAL PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE ADN DE VACUNO Y EQUINO EN ELABORADOS CÁRNICOS*

presentado por

HAIZEA ROMEO LOS ARCOS

(e)k aurkeztua

GRADO EN INNOVACIÓN DE PROCESOS Y PRODUCTOS ALIMENTARIOS

GRADUA ELIKAGAI PROZESU ETA PRODUKTUEN BERRIKUNTZAN

Mayo, 2021 / 2021, *Maiatza*

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
LABURPENA	5
1 INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
1.1 Fraudes y sustitución de especies.....	6
1.2 Normativa.....	7
1.2.1 Legislación europea	7
1.2.2 Legislación española.....	8
1.3 Técnica de autenticación.....	9
1.3.1 Técnicas de análisis de proteínas	9
1.3.2 Técnicas de análisis de ADN	13
1.4 PCR a tiempo real	16
1.4.1 Sistemas de detección de la fluorescencia en PCR a tiempo real	17
1.4.2 Instrumentación de la PCR a tiempo real	19
1.5 Identificación de especies mediante PCR a tiempo real y cuantificación de especies en alimentos	19
1.5.1 Identificación de especies	19
1.5.2 Cuantificación absoluta.....	19
1.5.3 Cuantificación relativa	20
2 OBJETIVOS	20
3 PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	20
4 MATERIALES Y MÉTODOS	21
4.1 Especies utilizadas y la obtención de las muestras	21
4.2 Técnica de extracción del ADN	21
4.3 Selección de cebadores.....	24
4.4 Amplificación del ADN mediante PCR cualitativa	25
4.5 Amplificación del ADN mediante PCR a tiempo real	26
4.6 Análisis de muestras con el procedimiento puesto a punto.....	29
4.7 Análisis estadísticos	31
5 RESULTADOS	31
5.1 Comparación y selección de método de extracción del ADN.....	31
5.2 Selección de cebadores.....	34
5.3 Amplificación del ADN mediante PCR cualitativa	35
5.4 Amplificación del ADN mediante PCR a tiempo real	36
5.5 Análisis de muestras con el procedimiento puesto a punto.....	42
6 CONCLUSIONES	45
7 BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de modificaciones de alimentos accidental e intencionada (Manning & Soon, 2016)	6
Figura 2. Esquema de los reactivos que participan en la PCR	14
Figura 3. Amplificación exponencial de los fragmentos de ADN por la técnica PCR.....	15
Figura 4. Gel de visualización de resultados de la PCR cualitativa.	15
Figura 5. Representación gráfica de las fases de la qPCR.....	16
Figura 6. Mecanismo de los agentes intercalantes.....	18
Figura 7. Esquema del diseño experimental seguido.....	21
Figura 8. Estructura de la columna para la purificación y elución del ADN con Wizard-DNA Clean-Up	23
Figura 9. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X del ADN extraído para las especies equino y vacuno, con los siguientes métodos; NucleoSpin (1), Fenol-cloroformo (2), Wizard (3).....	33
Figura 10. Representación gráfica de la curva de amplificación de la PCR a tiempo real para el gen Cyclic-GMP-phosphodiesterase.....	38
Figura 11. Representación gráfica de la curva de amplificación de la PCR a tiempo real para el gen Growth hormone receptor	38
Figura 12. Curva estándar del gen Growth hormone receptor (caballo)	39
Figura 13. Curva estándar del gen Cyclic-GMP-phosphodiesterase (vacuno).....	39
Figura 14. Curva de amplificación de las diferentes especies en mix con cebadores de vacuno	40
Figura 15. Curva de amplificación de las diferentes especies en mix con cebadores de caballo	40
Figura 16. Curva de amplificación de PCR a tiempo real de las cuatro muestras de hamburguesas en el mix de vacuno Vs. En el mix de caballo	42
Figura 17. Curva de amplificación de PCR a tiempo real de las ocho muestras de concentraciones diferentes de caballo en mix de vacuno	43
Figura 18. Curva de amplificación de PCR a tiempo real de las ocho muestras de concentraciones diferentes de caballo en mix de caballo	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Diseño de cebadores para las especies a estudiar; Cyclic-GMP-phosphodiesterase (vacuno), Growth hormone receptor (GHR) (equino)</i>	25
Tabla 2. <i>Ensayos realizados con diferentes concentraciones de reactivos</i>	26
Tabla 3. <i>Condiciones del termociclador utilizadas para la amplificación del ADN mediante la PCR a tiempo real</i>	27
Tabla 4. <i>Matriz de cebadores para los genes Growth hormone receptor y Cyclic-GMP-phosphodiesterase</i>	27
Tabla 5. <i>Preparación de muestras de hamburguesas con diferentes concentraciones de caballo para el ensayo 2</i>	30
Tabla 6. <i>Comparación estadística de los valores de las ratios (A260/280) y la cantidad [ng/μl] del ADN extraído mediante NucleoSpin, Fenol-cloroformo, Wizard, fenol-cloroformo + Wizard para las muestras de vacuno (V) y equino (C)</i>	32
Tabla 7. <i>Tiempo (minutos) necesarios para llevar a cabo cada técnica de extracción</i>	34
Tabla 8. <i>Comprobación in silico de los cebadores diseñados</i>	34
Tabla 9. <i>Condiciones utilizadas para la amplificación del gen Growth hormone receptos (amplificación de 108 pb) a partir de ADN de equino mediante PCR cualitativa</i>	35
Tabla 10. <i>Cantidades y concentraciones de los reactivos necesarios para la amplificación por PCR cualitativa para la detección de equino</i>	36
Tabla 11. <i>Resultados de los Ct obtenidas en los ensayos de la matriz de cebadores para los genes Cyclic-GMP-phosphodiesterase (vacuno), Growth hormone receptor (GHR) (caballo)</i>	36
Tabla 12. <i>Cálculo de la eficiencia de la reacción</i>	39
Tabla 13. <i>Valores de Ct obtenidos en el ensayo Límites de detección absolutos para las especies vacuno y caballo</i>	41
Tabla 14. <i>Valores de Ct obtenidos en el ensayo Límite de detección relativo para la especie caballo</i>	41
Tabla 15. <i>Valores de Ct obtenidos con los diferentes porcentajes de vacuno</i>	43
Tabla 16. <i>Valores de Ct obtenidos con los diferentes porcentajes de caballo</i>	44

RESUMEN

La industria alimentaria debe asegurar a las personas consumidoras que el producto que se les ofrece no sufre adulteraciones de ningún tipo. Ello se garantiza mediante diferentes normativas tanto en el marco legislativo europeo como en el estatal. En el caso de los productos cárnicos procesados, el fraude se produce, en la mayoría de los casos, por sustitución de especies. Para poder controlar este problema, existen diferentes técnicas analíticas que permiten identificar especies animales presentes en los alimentos.

Así, el objetivo del presente trabajo ha sido poner a punto una metodología para la identificación de las especies vacuno y equino basada en la PCR a tiempo real que sea rápida, sencilla y de elevada especificidad.

En primer lugar, se determinó la técnica más adecuada para la obtención del material genético, resultando seleccionado como óptimo, de entre los procedimientos ensayados, el kit comercial *NucleoSpin FOOD-colum*.

Para la detección de ADN de las especies en estudio, se seleccionaron y diseñaron cebadores que amplifican una secuencia de los genes *Cyclic-GMP-phosphodiester* y *Growth hormone receptor* (GHR) para vacuno y equino respectivamente.

Para poner a punto la técnica de PCR a tiempo real, se realizaron diferentes ensayos para optimizar las condiciones de amplificación y calcular las eficiencias de los genes seleccionados. Además, se llevaron a cabo los ensayos necesarios para determinar la sensibilidad y la especificidad de la técnica, dando como resultado un protocolo que puede emplearse para la detección e identificación de ADN de vacuno y equino en productos cárnicos.

Palabras clave: PCR a tiempo real, PCR, vacuno, equino,

ABSTRACT

The food industry must assure consumers that the product offered to them is not adulterated in any way. This is guaranteed by different regulations in both the European and national legislative frameworks. In the case of processed meat products, fraud is produced, in most cases, by substitution of species. In order to control this problem, there are different analytical techniques that make it possible to identify the animal species present in foods.

Thus, the objective of the present work was to develop a methodology for the identification of DNA from bovine and equine species based on real-time PCR, as it is fast, simple and of high specificity.

First, the most appropriate technique for obtaining the genetic material was determined, and the commercial *NucleoSpin FOOD-colum* kit was selected as the best among the procedures tested.

For the detection of DNA from the species under study, primers that amplify the sequences of the Cyclic-GMP-phosphodiester and Growth hormone receptor (GHR) genes for bovine and horses, respectively, were selected and designed.

To set the appropriate conditions for the real-time PCR technique, different assays were performed to optimize the amplification conditions and to calculate the efficiencies of the selected genes. In addition, the necessary tests were carried out to determine the sensitivity and specificity of the technique, resulting in the definition of a protocol that can be used for the detection and identification of bovine and equine DNA in meat products.

Keywords: real-time PCR, PCR, bovine, horse

LABURPENA

Elikagaien industriak kontsumitzaileei ziurtatu behar die eskaintzen zaien produktuak ez duela inolako aizunketarik. Hori hainbat arautegiren bidez bermatzen da, bai Europako legerian, bai Estatuan. Prozesatutako haragi-produktuen kasuan, gehienetan, espezieak ordezkatzearen bidez egiten da iruzurra. Arazo hori kontrolatzeko, hainbat teknika analitiko daude, zeinak elikagaietako animalia-espezieak identifikatzea ahalbidetzen duten.

Hala, lan honen helburua da behi- eta zaldi-espezieak identifikatzeko metodologia bat prestatzea, denbora errealeko PCRan oinarritua, azkarra, sinplea eta berezitasun handikoa.

Lehenik eta behin, material genetikoa lortzeko teknikarik egokiena zein den zehaztu zen, eta, probatutako prozeduren artean, hoberentzat hautatu zen *NukleoSpin FOOD-colum* kit komertziala.

Aztertzen ari diren espezieen DNA atzemateko, *Cyclic-gmp-phosphodiester* eta *Growth hormone receptor* (GHR) geneen sekuentziak handitzen dituzten *primer*-ak hautatu eta diseinatu ziren, behi eta zaldientzat, hurrenez hurren.

Denbora errealeko PCR teknika doitzeko, zenbait saiakuntza egin ziren amplifikazio-baldintzak optimizatzeke eta hautatutako geneen eraginkortasuna kalkulatzeko. Gainera, teknikaren sentikortasuna eta espezifikotasuna zehazteke beharrezko saiakuntzak egin ziren, eta, horren ondorioz, behi eta zaldien DNA detektatzeko eta identifikatzeko erabil daitekeen protokolo bat sortu zen.

Hitz gakoak: denbora errealeko PCR, PCR, behia, zaldia

1 INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Fraudes y sustitución de especies

En la actualidad, es de gran importancia para el sector alimentario garantizar la integridad de los alimentos y asegurar que estos no sufran adulteraciones de ningún tipo.

En este ámbito se pueden dar modificaciones tanto no intencionadas como intencionadas. En el primer caso se trata de **adulteraciones accidentales**, que son las relacionadas con la calidad (“*food quality*”) y la inocuidad de los productos (“*food safety*”), y que pueden llegar a desencadenar situaciones de enfermedades transmitida por alimentos. En el segundo caso se habla de **adulteraciones intencionadas** (“*food crime*”) cuando están relacionadas con fraudes alimentarios que se producen con fines económicos (“*food fraud*”) o, en casos más extremos, con el fin de producir una contaminación intencionada para causar un daño a los consumidores (“*food defence*”) (Manning & Soon, 2016), según se muestra en la siguiente Figura 1.

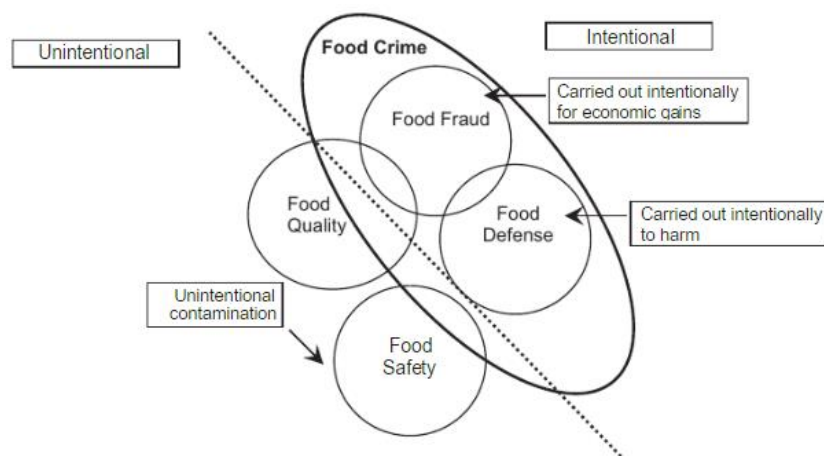


Figura 1. Tipos de modificaciones de alimentos accidental e intencionada (Manning & Soon, 2016)

Según la definición de Spink & Moyer, (2011) el fraude alimentario “es un término genérico utilizado para abarcar la sustitución, adición, manipulación o representación deliberada e intencional de alimentos, ingredientes alimenticios o envases de alimentos, o declaraciones falsas o engañosas sobre un producto, con fines económicos”.

Entre los tipos de fraude alimentario citados anteriormente, el denominado “de sustitución”, consiste -generalmente- en la utilización de ingredientes de menor valor económico que el declarado en el etiquetado, para así poder obtener una ganancia económica ilícita.

En el caso del sector cárnico esto ocurre más frecuentemente en productos procesados como son las hamburguesas, salchichas, albóndigas, etc. Esto es probablemente debido a que las características morfológicas de la carne empleada para elaborar estos productos se pierden fácilmente en los procesos de fabricación –mezclado, picado, calentamiento...-. Por lo tanto,

el procesado hace que los productos cárnicos sean más vulnerables a la adulteración (Kang & Tanaka, 2018). Además, en estos alimentos la carne es la materia prima y, por lo tanto, la sustitución -con carne de especies o de piezas de menor valor económico- disminuye notablemente los costes de producción (Méndez, 2014). Un ejemplo sería la utilización de carne de pollo en elaborados de oca o pato o de cerdo o caballo en productos de carne de ternera.

En este sentido, uno de los casos relacionados con fraudes alimentarios de mayor impacto social en la Unión Europea ocurrió en el año 2013 cuando la Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda dio a conocer evidencias sobre la adulteración de productos cárnicos etiquetados como vacuno con carne de caballo en algunos países de la Unión Europea (Méndez, 2014).

Dicho fraude “de sustitución” puede trascender al mero interés económico constituyendo un fraude ético. Es evidente que en la sociedad actual hay un gran número de personas que no consumen carne de determinadas especies, como ocurre con las que profesan las religiones judaica y musulmana, en el caso de la carne porcina, o que rechazan el consumo total de carne o de algunas especies por decisión propia (motivos culturales, gastronómicos, de salud...).

Es posible que la presencia de otras especies diferentes a la declarada se deba a una contaminación cruzada ya que, en una planta de producción donde se procesan productos cuyos ingredientes proceden de diferentes especies, la total ausencia de contaminación es muy complicada de obtener (Ortíz, 2017), si bien, la contaminación cruzada entre carnes de diferentes especies destinadas al consumo humano no supone ningún riesgo sanitario (Ortíz, 2017).

1.2 Normativa

1.2.1 Legislación europea

En el marco legislativo europeo hay varios reglamentos que regulan de una manera general la clasificación, los aditivos, los controles oficiales, la calidad y las condiciones de higiene que ha de tener la carne y los derivados cárnicos. Estos reglamentos son;

- Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (Comisión de las CE, 2004).
- Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a las categorías de carnes y a la utilización de aditivos alimentarios en preparados de carne. Cuyo Anexo II ha sido modificado por el Reglamento (UE) N° 601/2014 de la Comisión de 4 de junio de 2014 (Comisión de las CE, 2008); (Comisión de la UE, 2014).
- Reglamento de ejecución (UE) N° 2019/627 de la Comisión de 15 de marzo 2019 por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano (Comisión de la UE, 2019).

Respecto a las prácticas fraudulentas, los principios generales de la legislación alimentaria de la UE, que establece el Reglamento (CE) N° 178/ 2002, prohíben la comercialización de alimentos que no sean seguros, así como las prácticas de fraude, la adulteración de alimentos y otras prácticas similares que puedan resultar engañosas para las personas consumidoras (Comisión de las CE, 2002).

También existe reglamentación -como es el caso del Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 octubre de 2011- que tiene como objetivo, además de asegurar el correcto funcionamiento del mercado interior, asentar las bases que puedan garantizar a los consumidores un elevado nivel de protección en relación con la información alimentaria. Todo esto, teniendo en cuenta las diferencias en su percepción y sus necesidades de información: es decir, garantizando el derecho de los consumidores a la información. El citado Reglamento, mediante el artículo 18 (Capítulo IV, sección 2, apartado 1), establece que: *“La lista de ingredientes estará encabezada o precedida por un título adecuado que conste o incluya la palabra «ingredientes». En ella se incluirán todos los ingredientes del alimento, en orden decreciente de peso, según se incorporen en el momento de su uso para la fabricación del alimento.”* (Comisión de la UE, 2011)

En el caso concreto de la carne de vacuno, ha sido necesario crear un marco legislativo en virtud del cual se facilite información a las personas consumidoras mediante un etiquetado adecuado y claro del producto. Todo ello, con el objetivo de reforzar la confianza de la persona consumidora en dicho producto y evitar que se produzcan engaños. Es por esto, por lo que se aprobó el Reglamento (CE) N° 1760/2000 del Parlamento europeo y del Consejo de 17 de julio de 2000 por el cual se establece un sistema de identificación y registro de los animales de la especie bovina y relativo al etiquetado de la carne de vacuno y de los productos a base de carne de vacuno; y, en su desarrollo, el Reglamento (CE) N° 1825/2000 de la Comisión de 25 de agosto de 2000, por el que se establecen disposiciones de aplicación de anteriormente citado (Comisión de las CE, 2000a); (Comisión de las CE, 2000b).

1.2.2 Legislación española

En el Estado español existe legislación que regula de manera general la calidad de la carne y derivados cárnicos. Dicha legislación es aplicable a todos los productos cárnicos elaborados y comercializados en España y tiene como objetivo establecer *“...la caracterización de los derivados cárnicos en función del tratamiento a los que han sido sometidos, los factores de composición y calidad, el etiquetado...”* (Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos., 2014).

Las disposiciones legislativas europeas respecto del etiquetado de la carne de vacuno (Reglamentos ya citados), se materializan en la legislación española mediante Real Decreto (Real Decreto 1698/2003, de 12 de diciembre, por el que se establecen disposiciones de aplicación de los Reglamentos comunitarios sobre el sistema de etiquetado de la carne de vacuno., 2003).

La legislación española, mediante acuerdo del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, señaló un caso excepcional en la denominación de venta de las llamadas “Burger meat”. Establece que, en estas: “...no es necesario incluir la indicación de la especie o especies animales de las que procede la carne. No obstante, en la lista de ingredientes figurarán, en orden decreciente de peso, todos los ingredientes, es decir, todas las carnes utilizadas especificando la especie animal.”(Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2015)

En relación con la contaminación cruzada, mencionada en el anterior apartado, la Recomendación de la Comisión Europea de 19 de febrero de 2013 sobre un plan coordinado de control para establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de determinados alimentos, exhorta a los estados miembros a desarrollar un conjunto de controles de productos alimenticios comercializados o etiquetados como carne de vacuno y les insta a realizar un seguimiento de aquellas muestras en que la presencia de carne de caballo supere el 1%. Este hecho ha desencadenado en la prensa generalista la creencia, errónea, de que el 1% es el umbral tolerable a partir del cual se considera fraude alimentario (Comisión de la UE, 2013).

Es importante remarcar que, si en un producto se detecta presencia de otra especie a la declarada en el etiquetado, siempre y cuando no represente ningún riesgo para la salud y, mientras se trate de un hecho involuntario y sin ánimo de engaño, no es merecedora de reprobación legal.

1.3 Técnica de autenticación

Existen diferentes técnicas moleculares que permiten la identificación de especies animales. Estos métodos deben detectar o determinar un componente natural de la carne que sea un indicador único de la especie de origen. Los lípidos, las proteínas y, más recientemente, los métodos basados en la detección de ADN han sido objetivo de los estudios de autenticación (Vallejo et al., 2005).

Estas técnicas de análisis y detección requieren una continua actualización y mejora ya que el desarrollo de métodos de análisis y detección precisos, prácticos y seguros (fiables) constituye una importante primera línea de defensa tanto para detectar como para disuadir el fraude alimentario (Kang & Tanaka, 2018). A continuación, se describen algunas de las técnicas más empleadas en la detección de fraude alimentario (Kang & Tanaka, 2018; Espinoza et al., 2015).

1.3.1 Técnicas de análisis de proteínas

Las proteínas son los componentes funcionales más importantes de los alimentos procedentes de músculos animales, a los que confieren muchos de los atributos fisicoquímicos y sensoriales deseables. Las proteínas musculares comprenden entre el 15 y el 22% del peso total del músculo y pueden dividirse en tres grandes grupos en función de sus características de solubilidad: proteínas sarcoplásmicas (solubles en agua), proteínas miofibrilares (solubles en sal), y proteínas estromales (insolubles) (Recio et al., 2001)

Las técnicas de autenticación de especies basadas en el análisis de proteínas incluyen diferentes métodos electroforéticos, cromatográficos, espectroscópicos e inmunológicos.

Técnicas electroforéticas:

La electroforesis es un método analítico que consiste en la separación de moléculas en un medio acuoso en base a su tamaño y carga eléctrica. Sometiéndolas a un campo eléctrico, las moléculas se separan embebidas en una matriz gelatinosa. La trama del gel permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las grandes, consiguiendo así, la separación deseada (Austin, s. f.).

La identificación de especies se consigue mediante la comparación del perfil electroforético obtenido a partir de las proteínas musculares de las muestras a analizar, con los patrones de bandas de muestras de referencia (Rodríguez, 2004).

Entre las diferentes técnicas electroforéticas se encuentra la electroforesis capilar, la electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS e isoelectroenfoque (IEF).

- Electroforesis capilar (CE):

La electroforesis capilar es una técnica analítica de separación de moléculas con idéntico cociente carga/masa y diferentes masas (Anguita Alegret, 2002). La separación de las moléculas se logra, sometiendo a un campo eléctrico en el interior de un tubo capilar de sílice (Fajardo Martín, 2009).

Algunas de las principales ventajas que presenta esta técnica con respecto a otras técnicas electroforéticas son: la total automatización del proceso, la elevada resolución o eficacia de separación, la rapidez (10-20 minutos) y la necesidad de pequeños volúmenes tanto de muestra como de tampón (Fajardo Martín, 2009);(Laboratorio de técnicas instrumentales UVa, s. f.)

Sin embargo, presenta una principal limitación que reside en la necesidad de poner a punto sistemas de detección adecuados y muy sensibles -debido a los pequeños volúmenes que se utilizan- para cada compuesto (Fajardo Martín, 2009).

- Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE):

El SDS (dodecil sulfato de sodio), es un detergente que, al unirse a las proteínas desnatura sus estructuras secundarias y terciarias no ligadas al sulfuro. De esta forma se forma un complejo proteína-anión al que se le confiere una carga neta negativa (Carrillo, 2012).

La técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) permite separar las proteínas según su tamaño molecular, haciéndolas pasar por un gel formado por un copolímero entrecruzado de Bis-Acrilamida, sobre el cual se adhieren las proteínas (Carrillo, 2012). Las moléculas de menor peso molecular -cadena polipeptídicas

más corta-, migrarán a través del gel a mayor velocidad, mientras que las que posean un peso molecular mayor -cadena polipeptídica más larga- lo harán posteriormente. (Brunelle & Green, 2014).

Esta técnica tiene la principal ventaja de tener una mejor resolución de los resultados que otras técnicas electroforéticas – Se logra discriminar proteínas que tienen un peso molecular cercano-. Además, el método de separación SDS-PAGE es; rápido, reproducible y de bajo costo a nivel de muestra (Carrillo, 2012).

- Isoelectroenfoque (IEF):

El punto isoeléctrico (PI) se define como el pH en el que una molécula tiene la misma carga positiva que negativa. Es decir, es el pH al que la molécula tiene una carga neta neutra.

En el caso de las proteínas, el punto isoeléctrico de cada aminoácido es específico, por lo que en función de los aminoácidos que conformen la proteína -tipo y orden-, esta tendrá su propia carga intrínseca y, por lo tanto, su propio punto isoeléctrico. Haciendo uso de esta característica, se realiza la separación mediante isoelectroenfoque.

La aplicación de la técnica espectroscópica IEF está orientada a la separación de moléculas anfotéricas como es el caso de las proteínas. Las moléculas migran al ánodo o al cátodo, bajo la acción de un campo eléctrico, a través de un gel con gradiente de pH. La migración se detiene en el punto del gradiente de pH donde su carga neta sea cero. Es decir, cuando el pH del gradiente es igual a su punto isoeléctrico, donde el campo eléctrico no tiene influencia sobre él (Fattori et al., 2009).

Técnicas cromatográficas:

Las cromatografías son otras de las técnicas analíticas utilizadas para la identificación de especies. Al igual que en las técnicas electroforéticas, la identificación se logra mediante la comparación de proteínas del alimento a analizar con perfiles procedentes de muestras de referencia (auténticas sin ninguna duda) (López et al., 2003).

Se basa en la separación de los componentes que integran una mezcla (gases o líquidos) distribuyéndolos en **dos fases**. Una de las fases es **estacionaria** (sus elementos se encuentran en reposo), mientras que la otra es **móvil** (sus elementos se mueven). La separación de proteínas se realiza en base a su polaridad, es decir, a su distribución entre una fase móvil polar y una fase orgánica que está fija a una matriz. Así, se obtienen perfiles cromatográficos de proteínas característicos de cada especie; que permiten su identificación mediante comparación con cromatogramas de referencia (Fajardo Martín, 2009).

Entre las diferentes modalidades, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las más avanzadas, siendo rápida, eficiente y pudiendo detectar cantidades tan pequeñas como picogramos de algunos analitos (Sandoval & Arturo, 2017)

Técnicas espectroscópicas

La espectroscopía se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, con absorción o emisión de energía radiante. En el caso de la espectroscopía del infrarrojo cercano (NIRS) mide la intensidad de la absorción de la luz infrarroja, por una muestra, en una longitud de onda específica (Luykx & van Ruth, 2008).

La identificación de especies animales mediante técnicas espectroscópicas se realiza gracias a las características espectrales específicas de cada una de ellas (Kulmyrzaev et al., 2007).

Esta técnica analítica es rápida, relativamente barata y tiene la gran ventaja de poderse aplicar fácilmente en los laboratorios de control y en línea en la fábrica para analizar los productos alimentarios (Luykx & van Ruth, 2008).

Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas se basan en la reacción específica entre antígeno y su respectivo anticuerpo. La rapidez, el coste del análisis, la disminución de la cantidad de muestra necesaria, el empleo de instrumental poco complejo y kits de pequeño tamaño, son algunas de las características que hacen ventajosa, en identificación de especies, esta técnica frente a las electroforéticas y de HPLC (Fajardo Martín, 2009).

- Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA):

La técnica inmunológica más empleada en la actualidad es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Esta técnica combina la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de los ensayos enzimáticos. Se basa en la formación de conjugados antígeno-anticuerpo y existen diferentes variantes de esta técnica dependiendo del componente de la reacción que se fije en la placa. En la identificación de especies los más empleados son (Rodríguez, 2004):

- a) ELISA indirecto, es el antígeno (Ag) el elemento que se fija en la fase sólida, y el anticuerpo (Ac) el que se une al antígeno inmovilizado. El anticuerpo puede estar directamente conjugado a una enzima o bien se incorpora un segundo anticuerpo marcado con una enzima que reconoce como antígeno al anterior. Para poder obtener el resultado, se adiciona el sustrato específico de la enzima que al degradarse da como resultado una reacción colorimétrica cuantificable por espectrofotometría.
- b) ELISA competitivo, también es el antígeno el elemento que se adsorbe a la fase sólida. Pero en este caso, se añaden conjuntamente una muestra que contiene una concentración desconocida de antígeno y un anticuerpo específico marcado con una enzima. De esta forma, los antígenos de la muestra competirán con los antígenos fijados por su unión al anticuerpo. Mediante un lavado, se eliminará el conjugado formado por los anticuerpos y los antígenos de la muestra. El resultado se obtiene cuantificando la reacción colorimétrica producida tras la adición del sustrato, de forma que esta es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente.
- c) ELISA "sándwich", es el anticuerpo el que se inmoviliza en la fase sólida y seguidamente se añade la muestra que contiene el antígeno. Tras un lavado que elimina los antígenos restantes,

se añade un segundo anticuerpo, esta vez, marcado con una enzima. La unión del segundo anticuerpo al antígeno se cuantifica por la reacción colorimétrica resultante de la degradación por el enzima del sustrato.

Ventajas y desventajas de las técnicas de análisis de proteínas

En general, las técnicas de identificación de especies basadas en el análisis de proteínas presentan la ventaja de ser técnicas rápidas, de bajo costo económico y sencillas. Sin embargo, el estudio de proteínas requiere que las muestras estén en buen estado, al ser las proteínas unas moléculas de poca resistencia térmica, resulta complicado el análisis de muestras que hayan sido procesadas térmicamente ya que, pueden estar desnaturalizadas. Además, dependiendo del tejido, las proteínas varían lo que dificulta el ensayo.

1.3.2 Técnicas de análisis de ADN

Las técnicas genéticas o de análisis de ADN se basan en el reconocimiento específico de fragmentos de ácidos nucleicos presentes en los seres vivos.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una biomolécula, que, en comparación con las proteínas, tiene una mayor estabilidad térmica, está presente en la mayoría de las células y permite obtener información independientemente del tejido de origen (Ballin et al., 2009). Además, el ADN puede proporcionar potencialmente más información que las proteínas -lo que permite la discriminación entre distintas especies y razas de animales, llegando incluso a nivel de individuo-, debido a las mutaciones del código genético y a la presencia de numerosas regiones no codificantes (Lockley & Bardsley, 2000). Todo esto hace que las técnicas de análisis basadas en el ADN sean más ventajosas que las basadas en el análisis de proteínas y que, por lo tanto, cada vez se empleen y desarrollen más.

Para la identificación de especies por medio de ácidos nucleicos es importante una selección adecuada de las regiones del ADN que se pretenden analizar. Estas se conocen como marcadores genéticos, (“dianas”, o *targets*) (Lockley & Bardsley, 2000). Dichas regiones han de acumular mutaciones a una velocidad suficiente como para que especies estrechamente relacionadas presenten diferencias en la secuencia nucleotídica, pero a su vez, que esta velocidad sea lo suficientemente lenta como para que tales diferencias no aparezcan dentro de la misma especie (López Andreo, 2012).

La técnica genética más empleada en la autenticación de especies es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica presenta diferentes variantes como el análisis de polimorfismos del ADN amplificado con cebadores arbitrarios (RAPD), el análisis de polimorfismos en la conformación de las cadenas sencillas de ADN amplificado por PCR (PCR-SSCP) o el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP). También puede aplicarse de forma conjunta con la secuenciación (PCR-secuenciación).

Fundamento teórico de la técnica PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en una reacción enzimática que replica o amplifica miles de copias de un fragmento concreto del ADN durante varios ciclos, debido a la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar el ADN en la célula (Tafur Culqui, 2018). Además de la polimerasa (Figura 2), para que la reacción se lleve a cabo son necesarios los cebadores o primers -que son cadenas cortas de oligonucleótidos que delimitan el fragmento a amplificar-, los cuatro nucleótidos (dNTPs) que componen el ADN, Cl_2Mg como cofactor enzimático, un tampón que mantiene el pH de la reacción estable ($pH=8$) y H_2O libre de nucleasas- (Tamay de Dios et al., 2013).

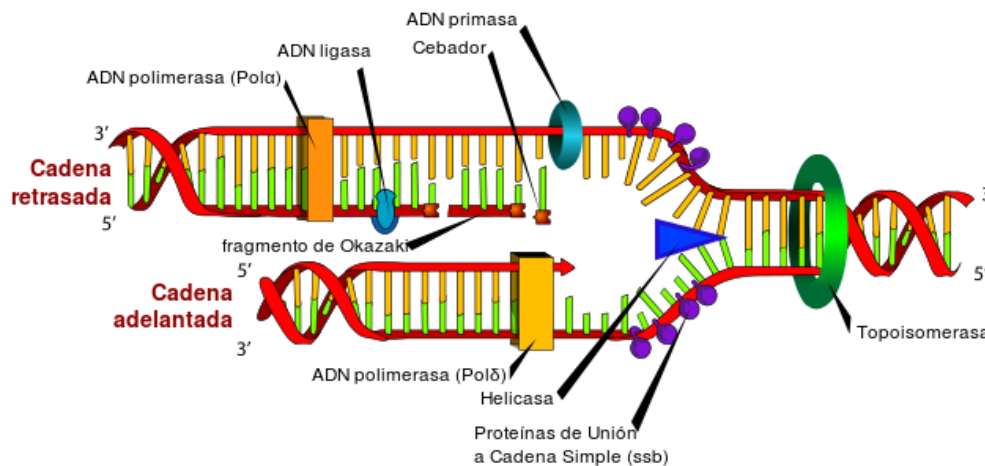


Figura 2. Esquema de los reactivos que participan en la PCR

La PCR tiene tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. En la primera, el ADN se calienta durante a una temperatura de $95^{\circ}C$. De esta forma, se consigue que las hebras del ADN se desnaturalicen y, por consiguiente, se separen y sirvan de molde para el siguiente paso. En la etapa de hibridación los cebadores se unen en el extremo 3' con la secuencia complementaria del ADN diana. Para que esto ocurra correctamente, es muy importante seleccionar una correcta la temperatura de hibridación o de melting (T_m), que suele estar entre $50-60^{\circ}C$. La extensión es la última fase en la que la ADN polimerasa comienza a sintetizar las nuevas cadenas de ADN complementarias al ADN molde, en la dirección 5'-3' de las hebras. Esta fase se da a $72^{\circ}C$ ya que esta es la temperatura a la que la enzima es funcional. Estas tres etapas se repiten a lo largo de 35 o 40 ciclos, de modo que las copias resultantes aumentan de manera exponencial, obteniendo millones de ellas a partir de una cantidad inicial muy pequeña de ADN. En una fase anterior a la fase cíclica, se procede a una desnaturalización inicial similar a la primera etapa descrita. Mientras que, una vez que ha finalizado la amplificación en la fase cíclica, hay una fase de extensión final que permite que la polimerasa termine de sintetizar las copias de las moléculas de ADN. En la Figura 3 se puede observar el proceso descrito.

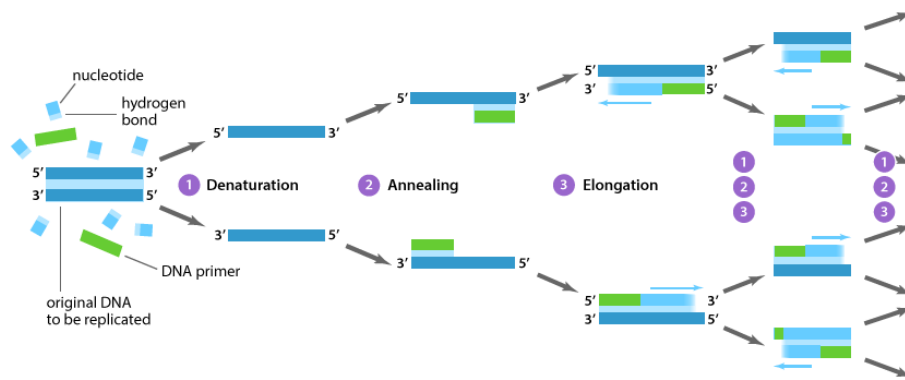


Figura 3. Amplificación exponencial de los fragmentos de ADN por la técnica PCR

Para visualizar y, por lo tanto, analizar el producto amplificado, se separan los fragmentos por medio de electroforesis. Esta puede ser en geles de agarosa o capilar. En el primer caso, el revelado se puede realizar mediante tinción empleando colorantes como el bromuro de etidio, tinción de plata o syber safe (los dos primeros, en la actualidad, son menos empleados debido a su toxicidad). Estos colorantes se unen al ADN amplificado, al aplicar luz UV se excitan y emiten una señal que permite la visualización mediante bandas, como se puede observar en el ejemplo de la Figura 4, de las muestras de ADN. Es imprescindible la utilización de un marcador de peso molecular (primera columna de la Figura 4) para conocer el tamaño de las bandas (número de pares de bases) que se obtienen. En el caso de que se utilice electroforesis capilar, se deben añadir fluorocromos a la reacción, de forma que serán detectados por medio de láser.

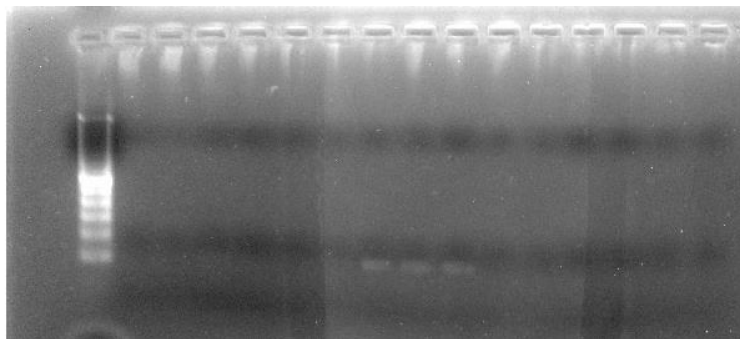


Figura 4. Gel de visualización de resultados de la PCR cualitativa.

La columna de la izquierda contiene el marcador de peso molecular (100 pb de diferencia entre cada banda). Las otras columnas contienen diferentes muestras de producto de PCR. En este caso, solo hay amplificación en tres muestras.

Como comprobante de que la PCR se ha realizado correctamente y que no ha habido ningún tipo de contaminación o error en el procedimiento, es necesaria la utilización de controles tanto positivos como negativos. Los primeros contienen todos los reactivos incluido ADN de referencia -con un número de pares de bases conocido-. Por lo tanto, en la visualización de los resultados se ha de observar una banda o señal positiva de amplificación. Los controles negativos, en cambio, contienen todos los reactivos, excepto, ADN. Este control es el

indicador de la contaminación. Por lo tanto, a la hora de visualizar los resultados, no se ha de ver ningún tipo de señal. En el caso contrario, si hay señal de amplificación, significa que en algún reactivo o material de los empleados hay restos de ADN que están contaminando el ensayo (Espinosa, 2005).

Ventajas y desventajas de las técnicas de análisis de ADN

Entre las ventajas principales de la técnica, se encuentran; la posibilidad de analizar muestras que hayan sido tratadas térmicamente, la posibilidad de realizar técnicas cuantitativas, la rapidez, la alta sensibilidad, especificidad y precisión de la técnica. Por lo contrario, estas son técnicas económicamente más costosas y, además, se requiere personal especializado para llevarlas a cabo.

1.4 PCR a tiempo real

La evolución de la técnica PCR ha supuesto el desarrollo de diferentes métodos y aplicaciones basadas en la misma. Ejemplo de ello es la PCR a tiempo real, también llamada qPCR. Esta técnica al igual que la PCR cualitativa, también implica la amplificación de fragmentos determinados de ADN. Sin embargo, a diferencia de la técnica convencional, se emplean compuestos fluorescentes que permiten la detección y cuantificación del producto de forma simultánea al desarrollo de la reacción, sin necesidad de realizar una electroforesis (Cadenas, 2013). Para que el termociclador pueda detectar la fluorescencia, es necesario que la cantidad de ADN amplificado supere el ciclo umbral (Ct o Cq), o ciclo en el que la fluorescencia de la muestra supera un umbral definido, que es inversamente proporcional a la cantidad inicial de ADN (Ferrando, 2013). Los diferentes receptores fluorescentes que se pueden utilizar para la detección y la cuantificación se describen en el siguiente apartado.

La amplificación se da en cuatro fases tal y como se puede observar en la Figura 5:

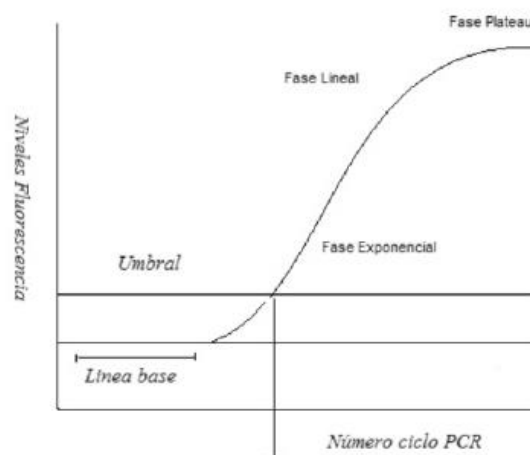


Figura 5. Representación gráfica de las fases de la qPCR

- Línea base: en esta fase la concentración inicial del ADN diana es baja y, por consiguiente, la fluorescencia no llega a ser detectada.
- Exponencial: esta fase comienza cuando la amplificación del ADN diana ha alcanzado el umbral de detección y la amplificación es exponencial en relación con la cantidad de ADN inicial.

- **Lineal:** se da una ralentización de la reacción ya que, al haber aumentado la concentración del fragmento diana, se reduce la disponibilidad de la enzima ADN polimerasa.
- **Plateau:** ocurre cuando el agotamiento de los reactivos llega al límite y la reacción se encuentra a máxima producción.

Es importante tener en cuenta que la concentración inicial del material genético influye en el proceso de amplificación, debido a que cuantas más copias de ADN inicial presente la muestra, antes se superara el umbral, es decir, menos ciclos serán necesarios para detectar fluorescencia. Por lo tanto, una muestra con una elevada concentración inicial del fragmento diana, obtendrá valores de Ct menores (Rodríguez, 2004).

La obtención de una curva de calibrado por medio de diluciones seriadas permite la cuantificación del ADN diana presente en la muestra debido, a la correlación entre la fluorescencia y cantidad de producto amplificado.

A la hora de realizar ensayos de PCR a tiempo real es importante tener claros varios conceptos sobre las características de la técnica como son:

- **Repetitividad:** se obtiene realizando varias mediciones de un mismo ensayo, en las mismas condiciones de medición en cuanto al operador, el equipo y al momento de ensayo y representa el grado de concordancia entre los resultados obtenidos.
- **Reproducibilidad:** es la capacidad de la técnica para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares -días diferentes-. Está determinada por el operador, el equipo y el momento de ensayo.
- **Sensibilidad o límite de detección:** es la cantidad más pequeña de copias del genoma diana que puede detectarse y distinguirse.
- **Especificidad:** es la capacidad de un ensayo para discriminar otras secuencias genómicas del ADN diana.

La repetitividad y la reproducibilidad están ligadas a la precisión de la técnica, mientras que la sensibilidad y la especificidad hacen referencia a la detección de la mínima concentración del fragmento diana sin interferencias.

La gran ventaja que presenta esta técnica en comparación con la PCR cualitativa convencional, es el ahorro de tiempo, ya que tal y como se ha comentado anteriormente, el resultado se conoce de manera simultánea al desarrollo de la reacción, además de permitir la cuantificación. Otra ventaja es que, al llevarse a cabo en sistemas cerrados, el riesgo de contaminación es menor. Además, esta técnica permite obtener resultados con una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia (Costa, 2004).

1.4.1 Sistemas de detección de la fluorescencia en PCR a tiempo real

Existen dos tipos de sistemas de detección de la fluorescencia en la PCR a tiempo real. Estos pueden ser agentes intercalantes o sondas de hibridación específicas.

Agentes intercalantes

También se denominan fluorocromos inespecíficos debido a que funcionan uniéndose de forma indiscriminada al ADN.

Cuando los fluorocromos se intercalan en las hebras de ADN emiten una fluorescencia considerablemente más intensa de la que tienen si no están asociados (Costa, 2004). La fluorescencia se genera por la oxidación que sufren los fluorocromos al entrar en contacto con el ADN; la detección de esta es proporcional al incremento de ADN obtenido en cada ciclo de la PCR (Tamay de Dios et al., 2013). El mecanismo de acción se muestra en la Figura 6. De esta forma, se logra detectar la presencia o ausencia de fragmentos diana, pero no se llega a determinar si corresponden al ADN de interés. Esto es una desventaja ya que, puede conducir a falsos positivos en caso de dimerización de los cebadores (Ferrando, 2013). Por ello, se deben realizar las comprobaciones necesarias para asegurar que se amplifica el fragmento diana y la fluorescencia no se debe a ampliificaciones inespecíficas. Entre estas comprobaciones están la secuenciación del fragmento amplificado y el análisis de las curvas de melting.

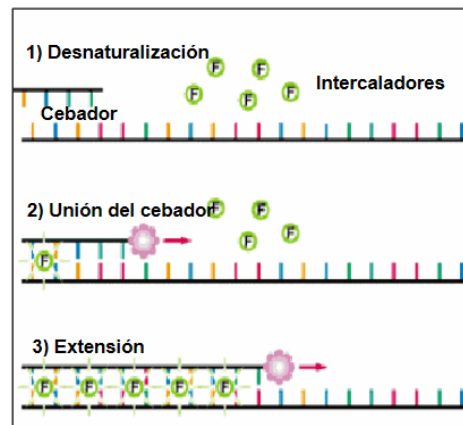


Figura 6. Mecanismo de los agentes intercalantes

El compuesto SybrGreen es el agente intercalante más empleado y consiste en una molécula cargada positivamente que, incrementa hasta 1.000 veces su fluorescencia al unirse con el ADN (Tamay de Dios et al., 2013).

Tal y como se ha comentado, la baja especificidad es una de las desventajas que presenta el sistema. No obstante, tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de reacción es muy sencilla y de que es un sistema más económico que las sondas específicas (Costa, 2004).

Sondas de hibridación específicas

En este caso, además de los cebadores, se añade una sonda que hibrida con el fragmento diana y que está marcada por un fluorocromo que, a su vez, está inactivado por una molécula llamada *quencher* (bloqueante o desactivador). En este sentido, las más empleadas son las sondas TaqMan (Costa, 2004).

El mecanismo de acción se basa en que cuando la ADN polimerasa alcanza la sonda, ésta se rompe y el fluoróforo queda liberado del *quencher* generando fluorescencia de forma proporcional a la síntesis de ADN de doble hebra.

1.4.2 Instrumentación de la PCR a tiempo real

La instrumentación necesaria para llevar a cabo la PCR a tiempo real es diferente y, algo más compleja, que la empleada en una PCR cualitativa. El termociclador junto con el ordenador y su correspondiente software son los principales instrumentos de la técnica.

Al igual que en la PCR convencional, en el termociclador se programan las condiciones de la reacción en cuanto al tiempo y la temperatura necesarias en cada una de las etapas de la PCR. En este caso, un lector de fluorescencia, mide ésta en cada una de las reacciones que están siendo sometidas a amplificación (Bialade, 2011).

En el ordenador, el software, registra y almacenan los datos obtenidos durante la PCR a tiempo real. Lo que permite analizarlos posteriormente con ayuda de gráficos y tablas de datos (Tamay de Dios et al., 2013).

1.5 Identificación de especies mediante PCR a tiempo real y cuantificación de especies en alimentos

1.5.1 Identificación de especies

La técnica PCR es una de las herramientas con las que puede contar la industria alimentaria para controlar la calidad, autenticidad y salubridad de la materia prima y producto final. Dicha técnica confiere la posibilidad de realizar las pruebas de una manera rápida y precisa de forma que, se puedan llegar a identificar a nivel molecular, las especies utilizadas, además de poder emplearse para otras aplicaciones como la detección de microorganismos -por ejemplo, patógenos-, la cuantificación de organismos modificados genéticamente, etc.

Tal y como se ha indicado a lo largo del trabajo, la identificación de especies es de suma importancia en la industria alimentaria y se puede lograr haciendo uso de técnicas selectivas que utilicen ADN específico de cada una de las especies (especie-específico) (López et al., 2003).

1.5.2 Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta es el valor correspondiente a la cantidad de ADN diana que hay en la muestra. Se obtiene realizando una qPCR con diferentes diluciones, de concentraciones conocidas del ADN diana, y generando, con los Ct obtenidos para cada una de ellas, una curva de calibración. De esta forma, se determina una relación lineal entre ambos parámetros. Hay que tener presente que, a pesar de que a veces se indique el valor obtenido en unidades de masa de ADN, realmente, mediante qPCR, sólo es posible cuantificar el número de copias de ADN diana presente al inicio de la reacción. Por lo tanto, es más apropiado expresar la cuantificación absoluta como el número de copias del ADN diana (López Andreo, 2012).

1.5.3 Cuantificación relativa

Hace referencia al cálculo de la relación entre la cantidad de ADN presente en la muestra y la cantidad de otro ADN utilizado como referencia, sin conocer previamente las concentraciones de ninguno de los dos ADNs. La cuantificación relativa, permite, por ejemplo, determinar el contenido de las diferentes especies que hay en la muestra del alimento. En este caso, para cada especie será necesario diseñar un sistema de detección constituido por, cebadores específicos y, dependiendo de la química elegida, la sonda. Además, será necesario diseñar otro sistema que sea común a todas las especies que se pretendan estudiar, para emplearlo como referencia. Si las eficiencias de reacción son iguales para todos los sistemas de detección empleados, para cada especie se puede obtener un valor de $\Delta CT = CT_{\text{especie}} - CT_{\text{referencia}}$ y su contenido en porcentaje: $\% \text{ de la especie} = \frac{2^{-\Delta CT}}{100}$ (López Andreo, 2012).

2 OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es poner a punto una metodología basada en la PCR a tiempo real -para la detección de ADN- que sea rápida, sencilla y de elevada especificidad, que permita la identificación de especies diferentes a las declaradas en el etiquetado de productos procesados de carne de vacuno.

El **objetivo específico** es diseñar los protocolos de PCR cualitativa y de PCR a tiempo real que permitan detectar y cuantificar la presencia de ADN de caballo en productos elaborados con carne de vacuno.

3 PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

La detección de especies diferentes a la declarada en el etiquetado en el caso de los productos procesados de carne de vacuno, bien por contaminaciones cruzadas bien por sustitución fraudulenta, es un problema recurrente y que puede tener un alto alcance. Los métodos analíticos que permiten asegurar de forma rápida y precisa que la información del etiquetado corresponde con la composición real del producto, suponen una herramienta para la defensa de la salud y los derechos de las personas consumidoras, así como una garantía para las diferentes empresas implicadas en la cadena de producción y distribución.

En base a ello, la hipótesis de partida de este trabajo es que la autenticación de especies empleadas para elaborar productos cárnicos por medio de la identificación de ADN es un método preciso, fiable y rápido que puede ser empleado para evitar fraudes alimentarios.

De acuerdo con la hipótesis anterior y con los objetivos planteados, el diseño experimental para llevar a cabo el trabajo ha comprendido tres etapas consecutivas. De esta forma, en primer lugar, se ha procedido a seleccionar el método más adecuado para obtener el ADN. Posteriormente, sea puesto a punto la metodología por medio de PCR a tiempo real para identificar las especies diana (vacuno y equino). Finalmente se han realizado ensayos para definir la sensibilidad y la especificidad la metodología propuesta (Figura 7).



Figura 7. Esquema del diseño experimental seguido

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Especies utilizadas y la obtención de las muestras

Para la elaboración de este trabajo se utilizaron diferentes especies animales: *Bos taurus* (vacuno), *Equus caballus* (caballo), *Ovis aries* (ovino), *Capra hircus* (cabra), *Sus scrofa* (Jabalí), *Sus scrofa domesticus* (cerdo), *Oryctolagus cuniculus* (conejo), *Anas platyrhynchos domesticus* (pato), *Gallus gallus* (pollo) y *Meleagris gallopavo f. domestica* (pavo).

Las muestras procedían de establecimientos comerciales, de piezas que permitían la identificación morfológica de la especie de procedencia, excepto en el caso del jabalí, que fue suministrado por cazadores locales.

4.2 Técnica de extracción del ADN

La optimización de la extracción del ADN se realizó empleando tres métodos de extracción: Fenol-cloroformo, NucleoSpin (KIT comercial) y Wizard-DNA Clean-Up (KIT comercial). Además, se empleó un cuarto método que consiste en la combinación de Fenol-cloroformo y Wizard-DNA Clean-Up. Todo esto se llevó a cabo en varias fases:

a. Preparación de muestras

Antes de comenzar con la extracción se realizó la preparación de las muestras. Para cada método de extracción se seleccionaron cuatro muestras de cada especie (4 de caballo y 4 de vacuno); y de cada una de estas se prepararon triplicados: así resultaron 12 muestras de cada especie.

Se pesaron alrededor de 100mg de cada una de las 72 muestras y se transfirieron a tubos eppendorf, tras cortarlas en pequeñas piezas con ayuda de unas pinzas y un bisturí, manteniendo siempre las muestras en hielo.

b. Extracción de ADN

1. Extracción de ADN por método Fenol-cloroformo

Se siguió un protocolo para extracción de ADN total basado en un método descrito por Sambrook et al., (1989). En cada tubo eppendorf (1,5ml) conteniendo las muestras se adicionaron 680µl de buffer de lisis, 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y 1µl de RNAsa (20 ng/µl). Se incubaron a 62°C durante 1h y media con agitación continua (300 rpm). Se añadieron 700µl de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos. Se trasvasó la fase superior acuosa de cada muestra a un nuevo tubo eppendorf (1,5ml) y se añadieron 700µl de cloroformo isoamílico (14:1) y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos, volviendo a realizar esta última operación. Se recogió la fase superior acuosa en un nuevo tubo eppendorf (2ml) y se le añadieron 1400 µl de etanol absoluto a -20°C y 70µl de acetato sódico (3M, pH 5,2). Con el fin de que las hebras de ADN se mezclaran bien con el etanol y precipitaran, se invirtieron los tubos lentamente hasta la visualización de dichas hebras. Se dejaron las muestras en el congelador (-80°C) durante un mínimo de 20 minutos para que el ADN precipitara. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm a 4°C durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante obtenido, se añadió 1 ml de etanol al 70% (-20°C) y se volvieron a centrifugar las muestras a 13.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Se volvió a tirar el sobrenadante y se dejaron las muestras secando durante 20 minutos: de esta forma se obtuvo un pellet. Añadiendo a cada tubo eppendorf 100µl de T10E1 y dejando las muestras en el termociclador durante 3h a 37°C en agitación continua (800 rpm) se consiguió disolver el pellet.

2. Extracción de ADN con NucleoSpin Food-column (KIT)

Se realizó el protocolo diseñado para extracción de ADN con el sistema comercial NucleoSpin® Food. De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, se añadieron a los tubos eppendorf con las muestras 550 µl de Buffer CF y 10 µl de Proteínasa K. Se dejaron incubar las muestras durante 30 minutos a 65°C. Una vez terminó el periodo de incubación, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 11.000 x g. Se transfirió a nuevos tubos eppendorf (1,5ml) la fase superior acuosa de cada muestra y se añadió un volumen de buffer C4 y de etanol absoluto. Para la unión del DNA se preparó para cada muestra una columna en un tubo para la recogida del líquido filtrado, se añadió la muestra y se centrifugó 1 minuto a 11.000 x g. Tras eliminar el filtrado y con el objetivo de lavar y secar la membrana de sílice, se realizó un primer lavado con 400 µl de buffer CQW. Se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 11.000 x g y se retiró el filtrado. Seguidamente se hicieron otros dos lavados con diferentes volúmenes de buffer C5: el primero con 700µl y el segundo con 200µl. Una vez que en las columnas de sílice sólo estaba retenido el ADN, se realizó la elución de éste, añadiendo a la columna 100µl de buffer CE y centrifugando durante 1 minuto a 11.000 x g.

3. Extracción de ADN con Wizard-DNA Clean-Up (KIT)

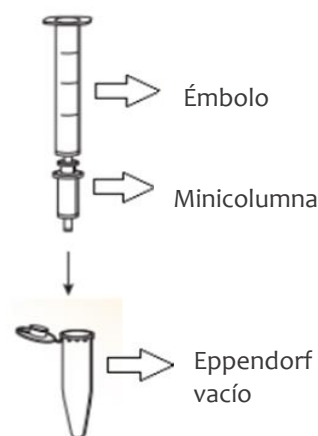


Figura 8. Estructura de la columna para la purificación y elución del ADN con Wizard-DNA Clean-Up

Se realizó el protocolo diseñado para extracción de ADN con el sistema comercial Wizard® DNA Clean-Up system. Siguiendo las indicaciones del fabricante, se añadieron a los tubos eppendorf 450 µl del tampón de extracción, 50 µl de guanidina de tiocianato (5M) y 40 µl de proteinasa K (600 U/ml) y se dejaron incubar durante 2 horas a 56°C. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 8.000 g para alcanzar un sobrenadante claro. En la purificación y elución del ADN se preparó, para cada una de las muestras, una estructura -tal y como se aprecia en la Figura 8- y se añadió 1ml del buffer de limpieza Wizard® DNA a cada sobrenadante conseguido en la etapa

anterior. Se añadió a las columnas la mezcla obtenida y con ayuda de un émbolo se creó vacío de forma que el ADN se retuviera en el filtro de la columna. Se realizó un lavado con isopropanol al 80% de la misma manera que en la anterior etapa. Se secaron las columnas centrifugándolas a máxima velocidad durante 2 minutos.

Se transfirieron las columnas a nuevos tubos eppendorf y se añadieron 50 µl de tampón TE para que el ADN retenido se eluyera.

4. Purificación con Wizard-DNA-Clean-Up, de las muestras obtenidas mediante Fenol-cloroformo:

Las muestras obtenidas mediante el método fenol-cloroformo, se purificaron siguiendo la segunda parte del protocolo del sistema comercial Wizard® DNA Clean-Up system, como se ha descrito en el apartado anterior.

c. Comparación de métodos de extracción de ADN

En orden a comparar los resultados obtenidos por medio de los 4 métodos ensayados, se procedió a; cuantificar la cantidad de ADN obtenido, a comprobar su calidad y a registrar el tiempo necesario para la extracción:

Cuantificación y calidad del ADN

En primer lugar, se obtuvieron los valores de la calidad (pureza) y la cantidad (concentración) de todas las muestras cuantificando las con el espectrofotómetro Nanodrop.

Con el equipo previamente calibrado, se empleó 1 µl de muestra para realizar las mediciones y obtener los valores de la concentración [ng/µl] y la pureza (A 260/280) del ADN extraído.

Integridad del ADN

Para la comprobación de la integridad del ADN, se comprobó la calidad del ADN obtenido en geles de agarosa. Para ello, se preparó un gel de 1% de agarosa con buffer TAE 1X y se añadieron 5 µl de muestra junto con 4 µl de tampón de carga (reactivo que facilita la visualización y sedimentación de los ácidos nucleicos en los pocillos). En el primero de los pocillos del gel se cargó el marcador de peso molecular y en el resto, las muestras por triplicado. Para la visualización del ADN se empleó un transiluminador de luz UV y los resultados obtenidos se interpretaron mediante apreciación visual.

Tiempo empleado para cada método

A medida que se realizaban los procedimientos de extracción, se calculó y anotó el tiempo necesario para realizar cada uno de ellos.

4.3 Selección de cebadores

Para la detección de ADN de las especies en estudio se empleó el gen: Cyclic-GMP-phosphodiesterase, para la identificación de la especie de vacuno y el gen Growth hormone receptor (GHR), para la identificación de la especie de equino. Para la selección de los marcadores se revisaron en la bibliografía secuencias que ya habían sido utilizados con éxito para la identificación de estas especies.

Para el diseño de los cebadores de la especie de equino, se hizo uso del software Primer3 teniendo en cuenta que, un correcto diseño de los cebadores es fundamental para obtener resultados deseados. A continuación, se muestran los principales criterios que se tuvieron en cuenta a la hora de diseñar los cebadores:

- Longitud del cebador: lo ideal es que la longitud de los cebadores sea de entre 16 a 28 pares de bases (pb). Además, la diferencia de longitud entre el cebador Forward y el Revers ha de ser de no más de 3pb (Chuang et al., 2013).
- Composición del cebador: la proporción de las bases nitrogenadas guanina y citosina (G-C) debe estar entre 40-60% (Chuang et al., 2013).
- Temperatura melting (Tm): ha de estar entre 50-62°C. Para que la PCR se pueda llevar a cabo con éxito, es importante que entre la Tm del cebador Forward y del Revers no haya una diferencia mayor de 5°C (Chuang et al., 2013).

Los cebadores empleados tanto en los ensayos de PCR cualitativa como en los de PCR a tiempo real fueron los siguientes:

Tabla 1. *Diseño de cebadores para las especies a estudiar; Cyclic-GMP-phosphodiesterase (vacuno), Growth hormone receptor (GHR) (equino)*

Gen	Cebador	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Tamaño cebador	Tamaño amplicón
Cyclic-GMP-phosphodiesterase	Forward	ACTCCTACCCATCATGCAGAT	21	102pb
	Reverse	TTTTTAAATATTTTCAGCTAAG AAAAAAAG	29	
Growth hormone receptor (GHR)	Forward	CTCAGCAGCCCAGTGTTATC	20	108pb
	Reverse	TCGGATTGCTTAGTTGAGTAT GG	23	

Una vez diseñados los cebadores por medio de la aplicación citada, se comprobó su especificidad *in silico* mediante el software BLAST del centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Por otro lado, los cebadores de la especie de vacuno se obtuvieron mediante búsqueda bibliográfica (Iwobi et al., 2017). Igualmente, se realizaron las comprobaciones *in silico* para esta pareja de cebadores.

4.4 Amplificación del ADN mediante PCR cualitativa

a. Optimización de las condiciones de reacción.

Con el objetivo de confirmar que los cebadores de equino amplificaban correctamente ADN de esta especie, se procedió a optimizar las condiciones de la PCR. Para ello, se realizaron ensayos variando a las condiciones del termociclador -tiempo y temperatura de hibridación (58°C durante 30 segundos; 59°C durante 30 segundos y 60°C durante 40segundos)- y la concentración de los reactivos -cebadores, dNTP's y muestra (Tabla 2)-.

Concentración de reactivos:

Se realizaron diferentes ensayos con distintas concentraciones de cebadores, dNTP's y muestra. Tal y como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. *Ensayos realizados con diferentes concentraciones de reactivos*

Ensayo	Cebadores (10 μ M)		dNTP's (10mM)	Muestra
	FW	RV		
1	0,3 μ M	0,3 μ M	0,2 mM	25 ng/reac
2	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 mM	25 ng/reac
3	0,2 μ M	0,2 μ M	0,2 mM	50 ng/reac
4	0,2 μ M	0,2 μ M	0,1 mM	25 ng/reac

b. Visualización (Electroforesis en gel de agarosa)

Para la visualización del producto amplificado de la PCR, se empleó un gel de agarosa al 2%. Se pesaron 1 o 2g de agarosa -dependiendo del tamaño del molde a emplear- y se añadieron a 50 o 100ml de tampón TBE 1X respectivamente. Para disolver la mezcla, se calentó en el microondas hasta que llegó a ebullición y, durante el calentamiento, se fue agitando el erlenmeyer. Una vez se había enfriado ligeramente, se añadieron 2,5 μ l de Syber Safe. Tras mezclar bien, se vertió toda la mezcla al molde en el que previamente se habían colocado los peines. Una vez el gel se había enfriado y, por consiguiente, solidificado, se colocó en la cubeta de electroforesis y se cubrió -hasta sumergir el gel- con buffer TBE 1X. En el primer pocillo se cargaron 6 μ l del marcador de peso molecular y en cada uno de los pocillos restantes, 4 μ l de tampón de carga y 10 μ l del producto PCR. Por último, se llevó a cabo la electroforesis a 100V durante 30-40 minutos. Una vez realizada la electroforesis, el gel se visualizó en el equipo Gel DoctTM EZ Imager (Biorad).

4.5 Amplificación del ADN mediante PCR a tiempo real

a. Optimización de las condiciones finales de reacción

Condiciones del termociclador

Para la amplificación del ADN por medio de PCR a tiempo real, se empleó el protocolo descrito en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones del termociclador utilizadas para la amplificación del ADN mediante la PCR a tiempo real

Etapa de la amplificación		Condiciones
Etapa de desnaturalización inicial		95°C / 5 minutos
Etapa cíclica de hibridación de los cebadores y amplificación (35 ciclos)	Fase de desnaturalización	95°C / 30 segundos
	Fase de hibridación	59°C / 30 segundos
	Fase de extensión	72°C / 30 segundos
Etapa de extensión final		72°C / 5 minutos

Concentración de cebadores

Con el objetivo de determinar la concentración óptima de cebadores, que logre amplificar y detectar correctamente ambas especies, se ensayaron diferentes concentraciones de los cebadores, según se indica en la matriz mostrada en la Tabla 4.

La comprobación se realizó para los genes Growth hormone receptor y Cyclic-GMP-phosphodiesterase, con tres concentraciones diferentes, tanto para el cebador Forward como para el Revers.

Tabla 4. Matriz de cebadores para los genes Growth hormone receptor y Cyclic-GMP-phosphodiesterase

FW \ RV	0,2 μ M	0,3 μ M	0,4 μ M
0,2 μ M	0,2 / 0,2	0,3 / 0,2	0,4 / 0,2
0,3 μ M	0,2 / 0,3	0,3 / 0,3	0,4 / 0,3
0,4 μ M	0,2 / 0,4	0,3 / 0,4	0,4 / 0,4

Para realizar los nueve ensayos resultantes de la matriz, se emplearon, por un lado, siete muestras de vacuno que contenían entre 100 y 180 ng/ μ l de ADN y, por otro, siete muestras de caballo que tenían una concentración de ADN de entre 96 y 150 ng/ μ l. Con el fin de poder unificar el volumen del ADN en reacción, todas las muestras fueron diluidas a 25ng/ μ l. Cada una de las muestras se estudió por triplicado.

Cada una de las reacciones, en un volumen final de 10 µl, contenía: 5 µl de Sybr Green Premix ex Taq, 2 µl de muestra, el volumen correspondiente a la concentración de cada pareja de cebadores y el volumen de H₂O miliQ necesario para llegar a 10 µl.

b. Validación de la técnica

Curvas estándar y eficiencias de amplificación

El objetivo de realizar curvas estándar de diluciones seriadas es poder determinar la relación entre el número de copias del fragmento de interés y los valores de C_q que se obtienen en la reacción.

Para ello, se seleccionaron tres muestras -de cada una de las especies- que tenían una concentración inicial similar, se realizaron 7 diluciones seriadas de cada una de ellas y se analizaron por triplicado. Las diluciones partieron de una concentración conocida y se realizaron 6 diluciones seriadas en la proporción 1/5 de forma que se obtuvieron 7 concentraciones decrecientes (desde 1/1 hasta 1/6.225).

Se preparó un mix diferente para cada una de las especies, de la siguiente manera: 5 µl de Sybr Green Premix ex Taq (2X), 0,2 µl del cebador Forward (10µM), 0,2 µl del cebador Reverse (10 µM) y 2,6 µl de H₂O miliQ, por cada una de las reacciones (en total 21 más 3 del control negativo).

En cada pocillo se dispensaron 8 µl del mix con ayuda de la pipeta automática y después se añadieron 2 µl de cada una de las muestras a estudiar. La PCR se llevó a cabo en el termociclador con las condiciones descritas en la Tabla 3.

Para la obtención de las curvas estándar, se representó el valor de Ct obtenido frente al logaritmo en base 10 de la concentración de ADN y, mediante una regresión lineal, los puntos obtenidos fueron ajustados a la recta. De esta manera, se obtuvo la ecuación de la recta y, por consiguiente, el coeficiente de correlación (R²) – que se emplea para determinar la linealidad del ensayo de qPCR- y el valor de la pendiente que permite obtener la eficiencia del ensayo (Bassy Álvarez et al., 2018):

$$Eficiencia = 10^{(-1/PENDIENTE)} - 1$$

Análisis de especificidad

Que la técnica PCR a tiempo real sea específica supondrá que la amplificación curra sólo con la especie de interés. Es decir, que los cebadores empleados sólo hibriden con el gen de la especie que se pretende estudiar y no con secuencias de ADN de otras especies.

Para analizar la especificidad de la técnica, se empleó ADN de 8 especies animales además del de vacuno y equino: ovino, cabra, cerdo, jabalí, conejo, pollo, pavo y pato.

Se realizaron dos ensayos: por un lado, se comprobó la especificidad de los cebadores de vacuno y por otro, la especificidad de los cebadores de caballo; ambos se realizaron de la manera que se describe a continuación:

En primer lugar, todas las muestras se igualaron a una concentración de 25ng/μl. Posteriormente, se prepararon dos mix: uno para la pareja de cebadores de vacuno y otro para la de caballo y cada uno de ellos con 5 μl de Sybr Green Premix ex Taq (2X), 0,2 μl del cebador Forward (10μM), 0,2 μl del cebador Reverse (10 μM) y 2,6 μl de H2O miliQ. A cada pocillo se le añadieron 8 μl del mix y 2 μl de cada una de las muestras a estudiar. La PCR se llevó a cabo en el termociclador con las condiciones descritas en la Tabla 3.

Ambos ensayos se realizaron con las muestras por triplicado y en tres días diferentes para obtener resultados en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

Límite de detección

El límite de detección de un ensayo hace referencia a la menor cantidad de un analito que puede ser detectado de forma constante, aunque tal vez no cuantificado como un valor exacto. Se ha definido también el límite de detección al 95% (LD_{95%}) como el límite en el que el ensayo detecta la presencia de analito en al menos el 95% de los casos. En el caso de la identificación de especies por medio de ADN, se puede considerar la concentración de ADN a la que se puede detectar el 95% de las muestras positivas en condiciones de 30 ciclos, garantizando que no haya más de un 5% de falsos negativos (Kang & Tanaka, 2018).

Por otro lado, el límite de cuantificación corresponde a la menor cantidad del analito que puede ser medido en una muestra y determinado de forma cuantitativa con precisión y exactitud aceptables, bajo determinadas condiciones experimentales.

En este caso se han determinado los límites de detección absolutos y relativos. Para ello, se realizaron distintas diluciones:

- a) Límites de detección absolutos: partiendo de extractos con una concentración de 100 ng de ADN / μl de cada una de las dos especies estudiadas, se obtuvieron extractos que contenían 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 ng/ μl ADN.
- b) Límite de detección relativo: se realizaron mezclas de ADN de vacuno y equino en las siguientes proporciones: 90% vacuno 10% equino; 95% vacuno 5% equino; 99,00% vacuno 1% equino; 99,50% vacuno 0,5% equino; 99,90% vacuno 0,1% equino; 99,95% vacuno 0,05% equino; 99,99% vacuno 0,01% equino; 99,999% vacuno 0,001% equino.

4.6 Análisis de muestras con el procedimiento puesto a punto

Con el objetivo de comprobar que el procedimiento puesto a punto es aplicable en una situación real, se llevaron a cabo dos ensayos. El primero consistió en analizar productos cárnicos comerciales elaborados y etiquetados como vacuno (hamburguesas). El segundo consistió en analizar muestras de dichos productos cárnicos a los que previamente se habían

añadido determinadas cantidades diferentes de carne de caballo (*spiked*). El procedimiento que se llevó a cabo fue el siguiente:

a. Obtención de las muestras

Las cuatro hamburguesas (H) de cuatro marcas diferentes, se adquirieron en un local comercial y fueron las siguientes

- H1: 80% carne de vacuno
- H2: 80% carne de vacuno
- H3: 47% carne de cerdo y 35% carne de vacuno
- H4: 89% carne de vacuno

La carne de caballo empleada para el segundo ensayo fue la misma que se había empleado previamente para extraer el ADN a estudiar.

b. Preparación de las muestras

Para el ensayo 2 las muestras se prepararon de la siguiente manera:

Se partió de 312g de carne (hamburguesa con una concentración 80% vacuno), a la que se le añadieron 25mg de carne de caballo y se mezcló con alta intensidad empleando una Thermomix; de esa mezcla se retiraron doce gramos, que constituyeron la primera muestra (0,01%). Al resultante (300g de hamburguesa), se le añadieron 100mg de carne de caballo y se mezcló de la misma manera, retirándose 10g de esta mezcla, lo que constituyó la segunda muestra (0,05%). Para las seis muestras restantes, se procedió de la misma manera que en la segunda de las citadas, variando las cantidades tal y como se expresa en la Tabla 5.

Tabla 5. *Preparación de muestras de hamburguesas con diferentes concentraciones de caballo para el ensayo 2*

Concentración de caballo	Carne de Hamburguesa	Vacuno (80%)	Carne de caballo	Muestra retirada
0,01%	312g	250g	25mg	12g
0,05 %	300g	240g	100mg	10g
0,1%	290g	232g	125mg	10g
0,5%	280g	224g	1g	10g
1%	270g	216g	1,250g	10g
2%	260g	208g	1,5g	10g
5%	250g	200g	6g	10g
10%	246g	192g	9.2g	10g

Tanto para el ensayo 1 como para el 2 se pesaron 100mg de cada una de las muestras por duplicado. Es decir, 8 muestras para el ensayo 1 y 16 muestras para el ensayo 2.

c. Extracción y cuantificación del ADN

La extracción de todas las muestras se realizó mediante el kit comercial NucleoSpin Food-colum siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.2.b, de forma que se obtuvieron 4 muestras para el ensayo 1 y 8 para el ensayo 2. La concentración de ADN de cada una de las muestras se cuantificó mediante espectrofotometría con ayuda del Nanodrop.

d. Análisis con PCR a tiempo real

Para ambos ensayos el procedimiento fue el descrito en el apartado 4.5. Validación de la técnica.

4.7 Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics. La calidad del ADN se analizó por medio de un análisis de la varianza (ANOVA) para los factores: cantidad de ADN obtenida y ratio 260/280, de acuerdo con el modelo:

$$y_{ij} = \mu + E_i + e_{ij} \quad [1]$$

Dónde y_i es la media individual, μ es la media, E_i es el efecto fijo del método de extracción ($i=1$ Fenol, $i=2$ NucleoSpin, $i=3$ Wizard, $i=4$ Fenol y Wizard) y e_{ij} es el efecto residual del error.

Se aplicó el mismo modelo [1], para analizar el efecto de la especie y de la concentración de cebadores:

- a) Especie: en el que y_i es la media individual, μ es la media, E_i es el efecto fijo de la especie ($i=1$ Vacuno, $i=2$ Caballo) y e_{ij} es el efecto residual del error.
- b) Concentración de cebadores: en el que y_i es la media individual, μ es la media, E_i es el efecto fijo de la concentración de cebadores ($i=1$ 0,2/0,2, $i=2$ 0,3/0,3, $i=3$ 0,4/0,4, $i=4$ 0,2/0,3, $i=5$ 0,2/0,4, $i=6$ 0,3/0,2, $i=7$ 0,3/0,4, $i=8$ 0,4/0,2, $i=9$ 0,4/0,3) y e_{ij} es el efecto residual del error.

Cuando era apropiado, se realizó una prueba Post Hoc basada en la comparación múltiple de medias por medio del test de Duncan con un nivel de confianza de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Comparación y selección de método de extracción del ADN

A la hora de decidir cuál era el método de extracción óptimo, se tuvieron en cuenta cuatro criterios: la concentración, la pureza, la integridad del ADN extraído y el tiempo necesario para obtener ADN en cantidad suficiente para realizar los ensayos, con la calidad adecuada (apartado 4.2).

En cuanto a la concentración y el tiempo, se considera mejor el método que proporciona un mayor rendimiento en el menor tiempo. El indicador utilizado para la determinación de la pureza es la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (ratio A 260/280). Para el caso del ADN es aceptado como puro una ratio de $\approx 1,8$. En caso de obtener un valor menor al anteriormente indicado, querrá decir que en la muestra hay presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes. Al contrario, si se obtiene un valor superior al deseado, será que la muestra tiene presencia de ARN (Desjardins & Conklin, 2010).

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos al comparar las técnicas empleadas para la extracción de ADN sobre las variables concentración y pureza.

Tabla 6. Comparación estadística de los valores de las ratios (A260/280) y la cantidad [ng/μl] del ADN extraído mediante NucleoSpin, Fenol-cloroformo, Wizard, fenol-cloroformo + Wizard para las muestras de vacuno (V) y equino (C)

Técnica	Muestra	[ng/μl]		A260/280	
		Media ± SD	Subconjuntos $\alpha=0,05$	Media ± SD	Subconjuntos $\alpha=0,05$
NUCLEOSPIN	Vacuno	110,24 ± 63,73	a	1,97 ± 0,15	a
	Caballo	75,54 ± 79,89	a	1,82 ± 0,23	a
FENOL- CLOROFORMO	Vacuno	559,42 ± 320,55	b	3,08 ± 0,34	b
	Caballo	164,52 ± 58,94	b	2,06 ± 0,08	b
WIZARD	Vacuno	100,37 ± 62,09	a	1,99 ± 0,52	a
	Caballo	127,47 ± 109,98	a	1,98 ± 0,15	a
FENOL- CLOROFORMO +WIZARD	Vacuno	40,04 ± 10,73	a	1,91 ± 0,16	a
	Caballo	50,71 ± 22,09	a	1,89 ± 0,31	a

Nota. Las letras diferentes indican que las medias son estadísticamente significativas con un nivel de significación $p < 0,05\%$

Tal y como se observa en la Tabla 6, en las dos variables citadas (concentración y pureza) se forman dos subconjuntos homogéneos (*a* y *b*), apreciándose que, en ambas, Fenol-cloroformo se diferencia del resto de las técnicas, es decir, esta técnica presenta resultados, en cuanto a la calidad y la cantidad del ADN extraído, significativamente diferentes del resto de técnicas ensayadas, que, a su vez, proporcionan resultados similares entre sí.

Esto supone que, mediante este método, se obtiene más ADN, pero con el inconveniente de que contiene más impurezas.

Por otro lado, el estudio estadístico realizado para comprobar si el factor especie tenía influencia sobre las variables concentración y pureza, determina -con un 95% de confianza- que para la extracción del ADN a partir de muestras de músculo procedente de caballo se obtiene una mayor concentración, pero, a su vez, una mayor impureza de ADN.

Para la interpretación del gel de agarosa, realizado con el fin de comprobar la integridad del material genético extraído, es necesario tener en cuenta que, cuanto más definida sean las bandas, más íntegro será el material genético, al contrario que ocurre en el caso de que dejen una estela. En la Figura 9 se puede observar el resultado de la visualización del gel:

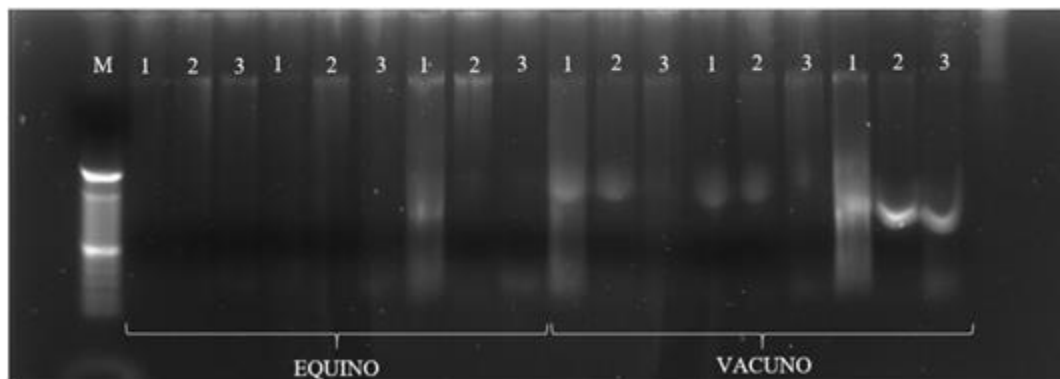


Figura 9. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X del ADN extraído para las especies equino y vacuno, con los siguientes métodos; NucleoSpin (1), Fenol-cloroformo (2), Wizard (3).

En el caso de las bandas correspondientes a la especie equino, el ADN que mejores resultados ofrece es el obtenido por medio de la técnica NucleoSpin Food-colum, aunque se aprecia una cierta degradación del mismo. En el caso de la especie de vacuno, se identifican bandas nítidas e intensas correspondientes al ADN extraído por las técnicas Fenol-cloroformo y Wizard y, con menor intensidad el ADN extraído por el método NucleoSpin Food-clomun, observándose que éste se encuentra íntegro.

Por último, en la Tabla 7, se muestran los tiempos de duración de cada una de las técnicas de extracción.

Tabla 7. *Tiempo (minutos) necesarios para llevar a cabo cada técnica de extracción*

Técnica	Tiempo (min)
NucleoSpin	115
Fenol-cloroformo	390
Wizard	190
Fenol-cloroformo + Wizard	490

Tal y como se puede observar en la Tabla 7, la técnica NucleoSpin Food-colum es la que requiere menor tiempo de entre las cuatro ensayadas.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos y haciendo un análisis conjunto de todos ellos, se descartó el método Fenol-cloroformo, no sólo por ser el método más costoso, en cuanto a tiempo, sino por ser el método con el que los extractos contenían mayor concentración de impurezas, que pueden inhibir la reacción de PCR. Por ello, en base al equilibrio entre la cantidad y la calidad del ADN obtenido, así como al tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, se determinó que la técnica NucleoSpin Food-colum era la más adecuada.

5.2 Selección de cebadores

Tras la realización de la comprobación *in silico* de los cebadores se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación (Tabla 8):

Tabla 8. *Comprobación in silico de los cebadores diseñados*

Secuencia (5'-3')	Length	Tm	GC%	Self C.	Self 3' C.
Equino					
CTCAGCAGCCCAGTGTTATC	20	58,34	55,00	3,00	2,00
TCGGATTGCTTAGTTGAGTATGG	23	53,31	43,48	3,00	0,00
Vacuno					
ACTCCTACCCATCATGCAGAT	21	58,30	47,62	6,00	6,00
TTTTTAAATATTTTCAGCTAAGAAA AAAAG	29	53,84	17,24	8,00	0,00

Fuente: BLAST; Nota. C.: Complementary.

Tal y como se puede comprobar en la Tabla 8, los cebadores diseñados y seleccionados para las especies de equino y vacuno, in sílico, cumplen con los criterios anteriormente mencionados.

5.3 Amplificación del ADN mediante PCR cualitativa

En cuanto a los diferentes ensayos para determinar las condiciones óptimas para la amplificación del gen Growth hormone receptor, se comprobó en primer lugar la combinación de tiempo y temperatura más adecuada para la etapa de hibridación (58°C durante 30 segundos; 59°C durante 30 segundos y 60°C durante 40 segundos). Tras comprobar los resultados obtenidos, se determinaron las condiciones finales del termociclador para amplificar este marcador (Tabla 9).

Tabla 9. *Condiciones utilizadas para la amplificación del gen Growth hormone receptos (amplificación de 108 pb) a partir de ADN de equino mediante PCR cualitativa*

Etapa de la amplificación	Condiciones
Etapa de desnaturalización inicial	95°C / 5 minutos
Etapa cíclica de hibridación de los cebadores y amplificación (35 ciclos)	Fase de desnaturalización 95°C / 30 segundos
	Fase de hibridación 59°C / 30 segundos
	Fase de extensión 72°C / 30 segundos
Etapa de extensión final	72°C / 5 minutos

En cuanto a las concentraciones de los reactivos, el ensayo 4 (Tabla 2, apartado 4.4) fue el que daba mejores resultados (bandas de mayor resolución en los geles de agarosa). De esta forma, las condiciones óptimas para la reacción, con un volumen total de 20µl fueron (Tabla 10):

Tabla 10. Cantidades y concentraciones de los reactivos necesarios para la amplificación por PCR cualitativa para la detección de equino

Reactivos([C]inicial)	[C]final	µl Reacción
Buffer (10X)	1X	2
dNTP's (10mM)	0,1 mM	0,2
Cebador FW (10 µM)	0,2 µM	0,4
Cebador RV (10 µM)	0,2 µM	0,4
Taq polimerasa (5U/ µl)	0,025 U	0,1
Muestra (10ng/ µl)	25 ng	2,5
H ₂ O	-	14,4

5.4 Amplificación del ADN mediante PCR a tiempo real

a. Optimización de las condiciones de reacción

Matriz de cebadores

Tras realizar los nueve ensayos de la matriz de cebadores, para cada uno de los genes a estudiar, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de los Ct obtenidas en los ensayos de la matriz de cebadores para los genes *Cyclic-GMP-phosphodiesterase (vacuno)*, *Growth hormone receptor (GHR) (caballo)*

Tratamiento	Caballo		Vacuno	
	Media ± SD	Subconjuntos	Media ± SD	Subconjuntos
		α= 0,05		α= 0,05
0,2/0,2	24,88 ± 0,80	a	24,88 ± 0,80	a
0,2/0,3	24,80 ± 0,91	a	24,80 ± 0,91	a
0,2/0,4	23,99 ± 5,57	a	25,19 ± 0,95	a
0,3/0,3	25,19 ± 0,91	a	25,19 ± 0,92	a
0,3/0,2	23,94 ± 5,62	a	25,08 ± 1,80	a

0,3/0,4	25,94 ± 0,79	a	25,94 ± 0,79	b
0,4/0,4	24,85 ± 1,20	a	24,85 ± 1,20	a
0,4/0,2	24,97 ± 0,85	a	24,97 ± 0,85	a
0,4/0,3	25,09 ± 0,86	a	25,09 ± 0,86	a
Blanco	-		-	

El análisis estadístico realizado para comprobar si existían diferencias significativas, dependiendo de la concentración de cebadores empleada, determinó que, con un 95% de confianza, en el caso de los resultados obtenidos para el gen de caballo, no había diferencias significativas en los valores de Ct obtenidos por cada uno de los tratamientos. Sin embargo, en el caso del gen de vacuno, se identificó que el tratamiento que empleaba 0,3 µM para el cebador reverse y 0,4 µM para el cebador forward presentaba un valor medio de Ct mayor al resto, por lo que esta opción quedó descartada.

Por todo ello, se consideró que la mejor opción para ambos casos, era emplear en las reacciones 0,2 µM de Reverse y 0,2 µM de Forward. De esta forma, se obtenía una amplificación correcta de los genes de interés, a la vez que se utilizaba una menor cantidad del reactivo.

b. Validación de la técnica

Curvas estándar y eficiencias

Con el fin de calcular la eficiencia de la reacción, se realizaron curvas estándar para cada uno de los genes (Growth hormone receptor y Cyclic-GMP-phosphodiesterase), que relacionan la concentración del ADN con el ciclo umbral (Ct).

En las Figuras 10 y 11, se pueden observar las representaciones gráficas de las curvas de amplificación de la PCR a tiempo real, realizada para estudiar la eficiencia correspondiente al ensayo de vacuno y caballo respectivamente.

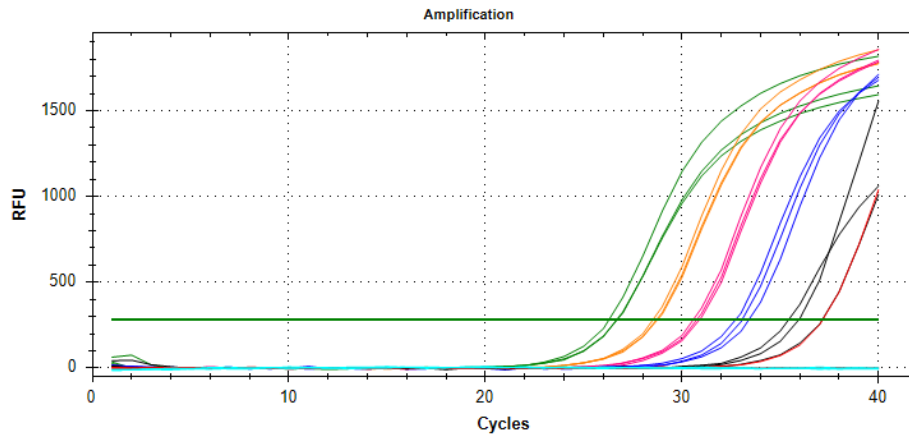


Figura 10. Representación gráfica de la curva de amplificación de la PCR a tiempo real para el gen Cyclic-GMP-phosphodiesterase

Los colores de las curvas hacen referencia a las diferentes diluciones ensayadas: verde (1/1); naranja (1/5); rosa (1/25); azul (1/125); negro (1/625); rojo (1/3125); cian (1/6250).

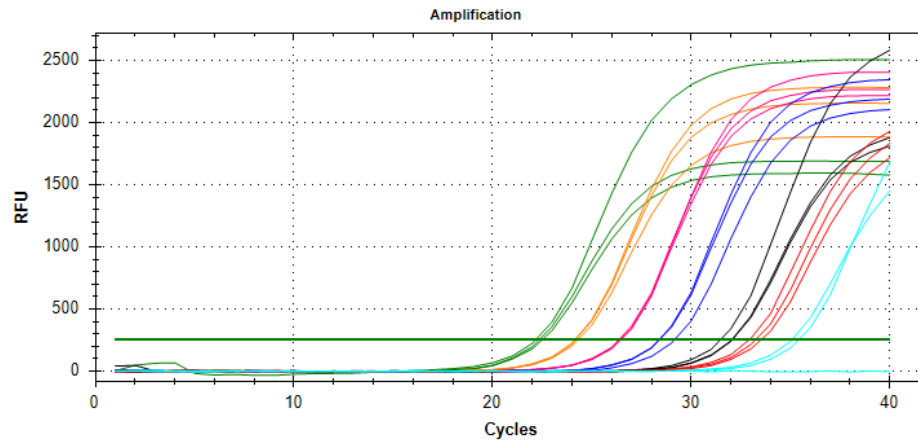


Figura 11. Representación gráfica de la curva de amplificación de la PCR a tiempo real para el gen Growth hormone receptor

Los colores de las curvas hacen referencia a las diferentes diluciones ensayadas: verde (1/1); naranja (1/5); rosa (1/25); azul (1/125); negro (1/625); rojo (1/3125); cian (1/6250).

A partir de los resultados anteriores, se representó el valor de Ct obteniendo frente al logaritmo en base 10 de la concentración de ADN y, mediante una regresión lineal, los puntos obtenidos fueron ajustados a la recta (Figuras 12 y 13):

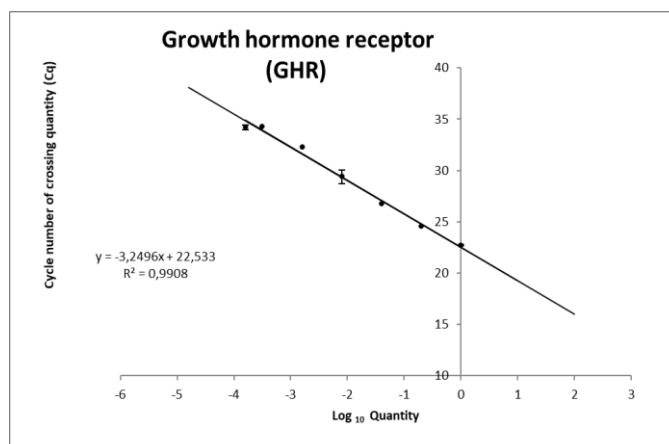


Figura 12. Curva estándar del gen Growth hormone receptor (caballo)

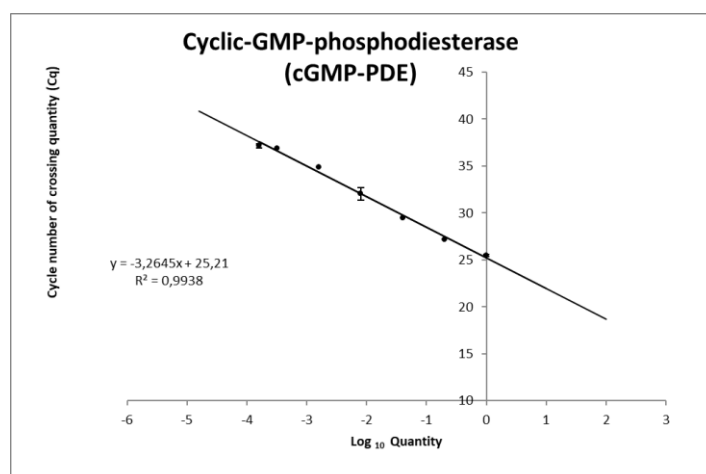


Figura 13. Curva estándar del gen Cyclic-GMP-phosphodiesterase (vacuno)

Teniendo en cuenta la fórmula descrita en el apartado 4.5. Validación de la técnica. Con los resultados obtenidos en los ensayos se han calculado las eficiencias de amplificación de los cebadores analizados (Tabla 12):

Tabla 12. Cálculo de la eficiencia de la reacción

Gen		R²	Pendiente	Eficiencia
Growth receptor	hormone	0,9908	3,2496	97,8%
Cyclic-GMP-phosphodiesterase		0,9938	3,2645	98,3%

Teóricamente un valor de $-3,322$ en la pendiente equivaldría a un 100% de la eficacia, por lo que se considera que una eficiencia aceptable se encuentra entre los valores 90% y 115% (Nolan et al., 2015). En este caso, al estar dentro de dicho rango, las eficiencias obtenidas en ambos ensayos se consideran válidas.

Análisis de especificidad

Los resultados obtenidos en el ensayo de especificidad se muestran en las Figuras 14 y 15, para los cebadores de vacuno y equino respectivamente.

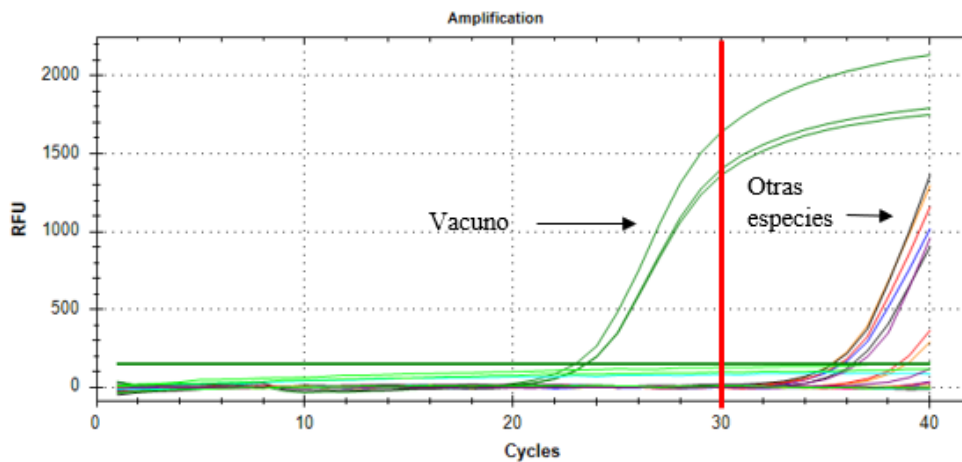


Figura 14. Curva de amplificación de las diferentes especies en mix con cebadores de vacuno

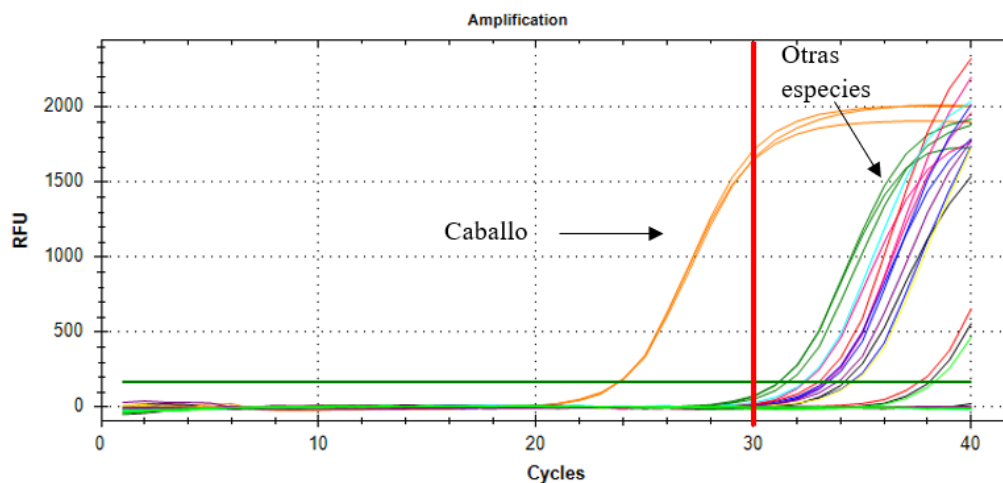


Figura 15. Curva de amplificación de las diferentes especies en mix con cebadores de caballo

En el caso del mix de vacuno se observa que solo el ADN de la especie de vacuno amplifica a valores de $Ct < 30$, por lo que se puede considerar que la técnica discrimina bien la especie de vacuno del resto de las especies y que por lo tanto los cebadores son específicos.

Ocurre igual en el caso del ensayo realizado para estudiar la especificidad de los cebadores de caballo. En este caso la única especie que amplificó con valores de $Ct < 30$ fue el caballo.

Por lo tanto, se puede concluir que estos cebadores también presentan una especificidad aceptable.

En cuanto a la interpretación de este ensayo, es necesario definir un punto de corte -un valor de Ct- a partir del cual deje de considerarse positivo el resultado. Diferentes estudios han comprobado que, limitando el punto de corte a 30 ciclos, se consiguen eliminar las reacciones cruzadas de los cebadores -estas reacciones se observan alrededor de 35 ciclos- (Dooley et al., 2004). En los ensayos de especificidad realizados en este trabajo, se observó que igualmente para las especies diana los valores de Ct siempre eran menores de 30 mientras que podía haber reacciones no específicas a partir del ciclo 30. Por todo esto, se decidió definir el punto de corte en un Ct de 30 ciclos. Por lo tanto, a partir de este umbral los resultados se considerarán negativos.

Límite de detección

En el ensayo correspondiente a los límites de detección absolutos, se obtuvieron los resultados que se observan a continuación (Tabla 13):

Tabla 13. *Valores de Ct obtenidos en el ensayo Límites de detección absolutos para las especies vacuno y caballo*

ng Totales	Valor Ct Vacuno ± SD	Valor Ct Caballo ± SD
100	27,07 ± 0,33	23,17 ± 0,40
10	30,90 ± 0,17	26,22 ± 0,09
1	33,40 ± 0,13	28,75 ± 0,25
0,1	37,76 ± 21,81	32,78 ± 0,97
0,01	37,81 ± 21,83	33,76 ± 10,99
0,001	-	-

Los resultados obtenidos muestran que, de manera consistente para ambas especies, la técnica detecta y amplifica a partir de 1 ng de ADN diana inicial. Si bien en el caso del ADN de equino el límite podría considerarse 0,1 ng, con los valores por debajo de 1 ng, los resultados no presentaron una alta repetibilidad, es decir, de todas las medidas que se han realizado, solo en algunas han sido detectadas esas cantidades.

En la Tabla 14, se reflejan los resultados obtenidos en el ensayo correspondiente al Límites de detección relativo.

Tabla 14. *Valores de Ct obtenidos en el ensayo Límite de detección relativo para la especie caballo*

% Caballo	Valor de Ct \pm SD
10	26,07 \pm 0,27
5	27,06 \pm 0,11
1	29,48 \pm 0,41
0,5	30,37 \pm 0,20
0,10	32,55 \pm 0,46
0,05	33,83 \pm 0,80
0,01	33,64 \pm 0,54
0,001	34,64 \pm 1,50

Los resultados obtenidos muestran que la detección se produce, a partir del 0,5% de caballo en 99,5% de vacuno. Con porcentajes menores que este resultado, se supera el umbral Ct<30 y esto se puede deber a reacciones cruzadas de cebadores.

5.5 Análisis de muestras con el procedimiento puesto a punto

El primer ensayo permitió comprobar que la composición de las muestras comerciales analizadas se ajustaba a su etiquetado. En la Figura 16 se puede observar que las cuatro muestras amplificaron solamente en las reacciones llevadas a cabo con el mix que contenía la pareja de cebadores de vacuno. En el caso del mix de caballo la única amplificación que se puede observar es la del control positivo, que demuestra que la reacción de amplificación ha sido correcta y que no hay presencia de la especie de caballo en ninguna de las cuatro muestras comerciales, con los límites de detección y especificidad de la técnica puesta a punto.

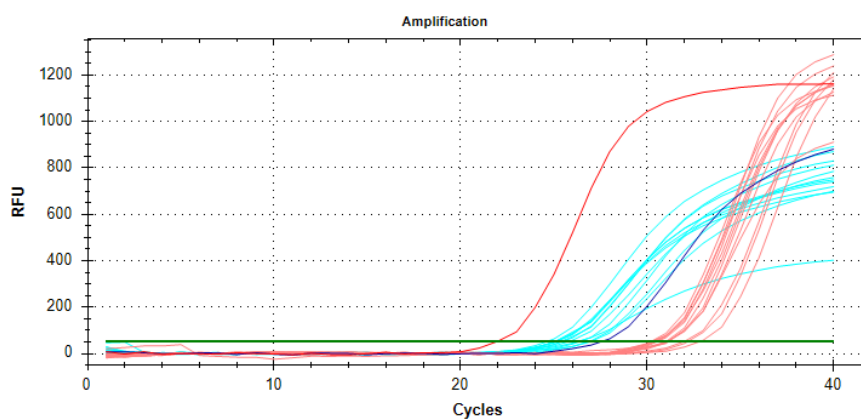


Figura 16. Curva de amplificación de PCR a tiempo real de las cuatro muestras de hamburguesas en el mix de vacuno Vs. En el mix de caballo

Azul (mix con los cebadores para la amplificación de vacuno); rojo (mix con los cebadores para la amplificación de caballo); Rojo oscuro (Control positivo de caballo); azul oscuro (control positivo de vacuno).

El segundo ensayo estaba diseñado para comprobar los límites de detección con muestras comerciales. En la Figura 17 se puede comprobar que todas las muestras empleadas en este ensayo amplificaron correctamente en las reacciones que empleaban los cebadores de vacuno, como cabía esperar.

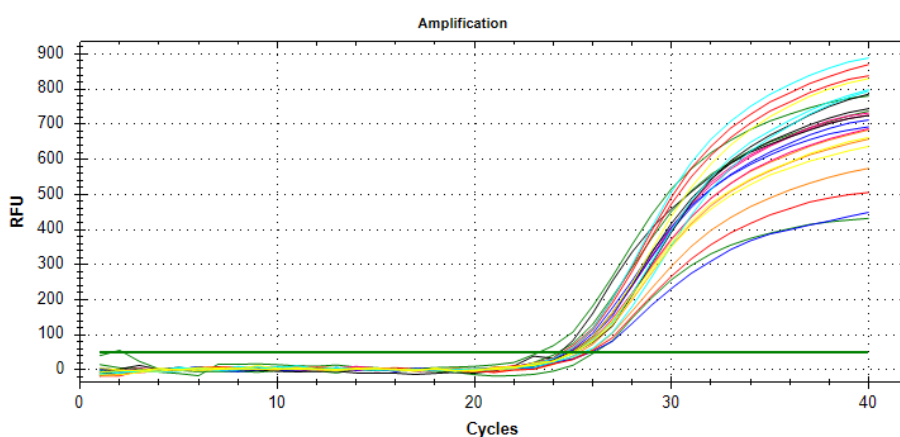


Figura 17. Curva de amplificación de PCR a tiempo real de las ocho muestras de concentraciones diferentes de caballo en mix de vacuno

Al ser muestras que contenían diferente proporción de carne de vacuno y caballo, siendo la carne de vacuno la mayoritaria (la cantidad menor era un 90%), la amplificación del vacuno se dio en todos los casos, con los distintos valores de Ct que se aprecian en la Tabla 15.

Tabla 15. *Valores de Ct obtenidos con los diferentes porcentajes de vacuno*

% Vacuno	Valor de Ct
99,99	24,57 ± 1,44
99,95	25,37 ± 0,35
99,9	24,95 ± 0,08
99,5	25,24 ± 0,62
99	24,80 ± 0,40
98	24,99 ± 0,75
95	25,05 ± 0,48
90	25,06 ± 0,06

En la Figura 18, a su vez, se observa la amplificación de las muestras en la reacción que contenía los cebadores de caballo. En este caso, se pudo detectar la carne de caballo en una proporción tan baja como 0,01%. Por otro lado, al estar las muestras contaminadas con diferentes cantidades de carne de caballo, se han obtenido valores de Ct diferentes para las distintas concentraciones añadidas (Tabla 16). Así, la curva de color marrón -la del valor más bajo de Ct-, corresponde a la muestra que contenía un 10% de carne de caballo y la de color verde a la muestra que contenía 0,01% de carne de caballo.

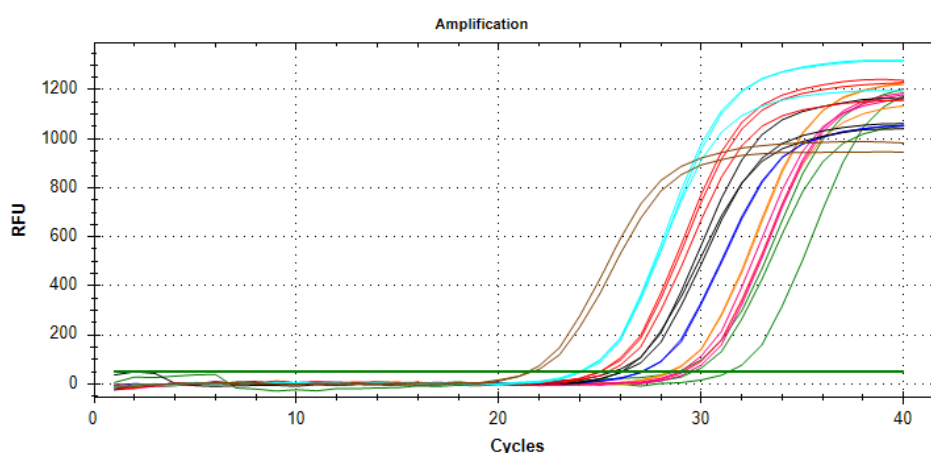


Figura 18. Curva de amplificación de PCR a tiempo real de las ocho muestras de concentraciones diferentes de caballo en mix de caballo

Tabla 16. *Valores de Ct obtenidos con los diferentes porcentajes de caballo*

% caballo	Valor de Ct
0,01	29,92 ± 1,32
0,05	28,67 ± 0,37
0,1	29,18 ± 0,20
0,5	27,19 ± 0,16
1	25,95 ± 0,26
2	25,15 ± 0,22
5	24,05 ± 0,04
10	22,20 ± 1,10

6 CONCLUSIONES

Tras realizar el análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede concluir que:

- a) El método de extracción de ADN más adecuado que permite obtener ADN de calidad apropiada y en cantidad suficiente, para el tipo de muestras empleadas, en el menor tiempo posible es NucleoSpin Food-column.
- b) Los cebadores diseñados para amplificar un amplicón de 108 pares de bases del gen Growth hormone receptor (GHR) con ADN procedente de equino amplifica correctamente en PCR cualitativa con las condiciones definidas, lo que va a permitir detectar la presencia o ausencia de la especie de caballo en productos procesados.
- c) La amplificación de ADN, de ambas especies, por medio de PCR a tiempo real, con las condiciones definidas, obtuvo eficiencias cercanas al 100% para ambas parejas de cebadores (amplicones en los genes Cyclic-GMP-phosphodiesterase para vacuno y Growth hormone receptor (GHR) para equino).
- d) En el caso de los límites de detección absolutos se ha determinado, para ambas especies que, 1 ng es la cantidad mínima de ADN diana que la técnica puede detectar en condiciones de repetibilidad. Además, se ha definido que el límite de detección relativo está en 0,5% de caballo en 99,5% de vacuno.
- e) La técnica permite detectar la presencia de ADN de la especie equina a partir de 1% en productos etiquetados como vacuno.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Anguita Alegret, G. (2002). Detección de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos madurados de oveja y cabra, utilizando anticuerpos monoclonales, policlonales y técnicas inmunoenzimáticas (ELISA). Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.
- Austin, M. D. (s. f.). Electroforesis | NHGRI. Genome.gov. Recuperado 27 de abril de 2021, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Electroforesis>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.003>
- Bassy Álvarez, O., Larigauderie, G., Ortega García, M., Granja Albarellós, C., & Cabria Ramos, J. C. (2018). Optimización y Validación de una PCR en Tiempo Real para la Rápida Identificación de *Bacillus thuringiensis*, Simulador de *Bacillus anthracis*. *Sanidad Militar*, 74(2), 84-89. <https://doi.org/10.4321/s1887-85712018000200004>
- Bialade, F. (2011). Diagnóstico Molecular: Una nueva herramienta en la detección de patógenos. PCR en Tiempo Real. *Biomérieux* 1, 30–33.
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). Chapter Twelve—One-dimensional SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D SDS-PAGE). En *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 151-159). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Cadenas, M. (2013). *Validación de un nuevo método molecular para el estudio de la viabilidad celular de Legionella pneumophila en muestras ambientales*.
- Carrillo, J. G. (2012). Evaluación de procedimientos de tinción para el análisis de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE). <http://www.repositorioinstitucional.uson.mx/bitstream/handle/unison/2145/carrillosotojorgeguillermol.pdf?sequence=1>
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541-1549. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Comisión de la UE. (2011). Reglamento (UE) N°1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n o 1924/2006 y (CE) n o 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n o 608/2004 de la Comisión (Texto pertinente a efectos del EEE). <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/2018-01-01>
- Comisión de la UE. (2013). Recomendación de la Comisión, de 19 de febrero de 2013, sobre un plan coordinado de control para establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de determinados alimentos. 5.
- Comisión de la UE. (2014). Reglamento (UE) N° 601/2014 de la comisión, de 4 de junio de 2014, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y

- del Consejo en lo que respecta a las categorías de carnes y a la utilización de aditivos alimentarios en preparados de carne. <http://data.europa.eu/eli/reg/2014/601/2014-06-05>
- Comisión de la UE. (2019). Reglamento de Ejecución (UE) 2019/627 de la Comisión, de 15 de marzo 2019, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se modifica el Reglamento (CE) n.o 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales (Texto pertinente a efectos del EEE) Texto pertinente a efectos del EEE. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2019/627/2021-01-01
- Comisión de las CE. (2000a). Reglamento (CE) N° 1760/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de julio de 2000 que establece un sistema de identificación y registro de los animales de la especie bovina y relativo al etiquetado de la carne de vacuno y de los productos a base de carne de vacuno y por el que se deroga el Reglamento (CE) n o 820/97 del Consejo. <http://data.europa.eu/eli/reg/2000/1760/2014-12-13>
- Comisión de las CE. (2000b). Reglamento (CE) N° 1825/2000 de la Comisión de 25 de agosto de 2000 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n o 1760/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta al etiquetado de la carne de vacuno y los productos a base de carne de vacuno. <http://data.europa.eu/eli/reg/2000/1825/2007-03-23>
- Comisión de las CE. (2002). Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/2021-05-26>
- Comisión de las CE. (2004). Reglamento (CE) N° 853/2004 del parlamento europeo y del consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0853-20210101&qid=1622186553847>
- Comisión de las CE. (2008). Reglamento (CE) N° 1333/2008 del parlamento europeo y del consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/1333/2020-12-23>
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J. Vis. Exp*, 45, e2565. <https://doi.org/10.3791/2565>
- Dooley, J. J., Paine, K. E., Garrett, S. D., & Brown, H. M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*, 68(3), 431-438. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.04.010>
- Espinosa, L. (2005). Guía práctica sobre la técnica de PCR. 24.
- Espinoza, T., Mesa, F. R., Valencia, E., & Quevedo, R. (2015). Types of fraud in meat and meat products: A review. *Scientia agropecuaria*, 223-233. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.09>

- Fajardo Martín, V. (2009). Autenticación de carnes procedentes de especies de caza mayor por técnicas genéticas. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones. <http://site.ebrary.com/id/10479487>
- Fattori, S. B., Garbini, A. I., Knecher, M. E., & Zubieta, O. (2009). Detección de suero de queso en leche en polvo por isoelectroenfoque. 8.
- Ferrando, N. (2013). Desarrollo y validación de un nuevo sistema de detección molecular basado en qPCR de *Legionella* spp. En muestras ambientales. 63.
- Iwobi, A., Sebah, D., Spielmann, G., Maggipinto, M., Schrempp, M., Kraemer, I., Gerdes, L., Busch, U., & Huber, I. (2017). A multiplex real-time PCR method for the quantitative determination of equine (horse) fractions in meat products. *Food Control*, 74, 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.035>
- Kang, T. S., & Tanaka, T. (2018). Comparison of quantitative methods based on SYBR Green real-time qPCR to estimate pork meat adulteration in processed beef products. *Food Chemistry*, 269, 549-558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.141>
- Kulmyrzaev, A. A., Karoui, R., Baerdemaeker, J. D., & Dufour, E. (2007). Infrared and Fluorescence Spectroscopic Techniques for the Determination of Nutritional Constituents in Foods. *International Journal of Food Properties*, 10(2), 299-320. <https://doi.org/10.1080/10942910601045305>
- Laboratorio de técnicas instrumentales UVa. (s. f.). Electroforesis capilar. Recuperado 5 de mayo de 2021, de <https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-qumicos/electroforesis-capilar>
- Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 11(2), 67-77. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00049-2)
- López Andreo, M. (2012, diciembre 13). Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real [Info:eu-repo/semantics/doctoralThesis]. Universidad Complutense de Madrid. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/20096/>
- López, M., Mallorquín, P., & Vera, M. (2003). Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria: Informe de vigilancia tecnológica. Genoma España.
- Luykx, D. M. A. M., & van Ruth, S. M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), 897-911. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.038>
- Manning, L., & Soon, J. M. (2016). Food safety, food fraud, and food defense: A fast evolving literature. *Journal of Food Science*, 81(4), R823-R834. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13256>
- Méndez, J. I. (2014). Detección de adulteración decarne cruda y procesada térmicamente mediante un protocolo analítico por qpcr múltiple. <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/368/1/MENDEZ-ROMERO-JI14.pdf>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2015). Obligatoriedad de la indicación de las especies animales en la denominación “burguer meat”.
- Nolan, M. J., Tomley, F. M., Kaiser, P., & Blake, D. P. (2015). Quantitative real-time PCR (qPCR) for *Eimeria tenella* replication—Implications for experimental refinement and animal

welfare. *Parasitology International*, 64(5), 464-470.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.06.010>

- Ortíz, S. M. (2017). Desarrollo de un sistema preventivo para reducir el riesgo de contaminación cruzada entre carnes de diferentes especies en una planta de procesados cárnicos. <https://ddd.uab.cat/record/187940>
- Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. (2014). 20.
- Real Decreto 1698/2003, de 12 de diciembre, por el que se establecen disposiciones de aplicación de los Reglamentos comunitarios sobre el sistema de etiquetado de la carne de vacuno. (2003). 8.
- Recio, I., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2001). Capillary electrophoresis for the analysis of food proteins of animal origin. *ELECTROPHORESIS*, 22(8), 1489-1502. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200105\)22:8<1489::AID-ELPS1489>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200105)22:8<1489::AID-ELPS1489>3.0.CO;2-G)
- Rodríguez, M. Á. (2004). Utilización de técnicas genéticas (PCR y PCR cuantitativo en tiempo real) e inmunológicas (ELISA), para la detección y cuantificación de diferentes especies animales en «foie gras»: Memoria presentada para optar al grado de doctor por Miguel Ángel Rodríguez Ramos. [Universidad Complutense], Servicio de Publicaciones.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Edition.
- Sandoval, A., & Arturo, M. (2017). Técnicas de identificación de aminoácidos en alimentos para animales mayores. Universidad Privada Norbert Wiener. <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/1983>
- Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*, 76(9), R157-163. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02417.x>
- Tafur Culqui, J. (2018). Identificación de especies cárnicas comerciales mediante el uso de PCR-RFLP en Amazonas [Thesis, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza - UNTRM]. En Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza—UNTRM. <http://repositorio.untrm.edu.pe/handle/UNTRM/1650>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Vallejo, B., González-Córdova, A. F., Mazorra-Manzano, M. A., & Rodríguez-Ramírez, R. (2005). Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *Journal of Separation Science*, 28(9-10), 826-836. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500013>