



**Centro de Investigación en  
Alimentación y Desarrollo, A. C.**

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO ANALÍTICO PARA  
LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CERDO Y  
PAVO EN JAMONES MEDIANTE qPCR**

---

Por:

**José Daniel Wicochea Rodríguez**

TESIS APROBADA POR LA

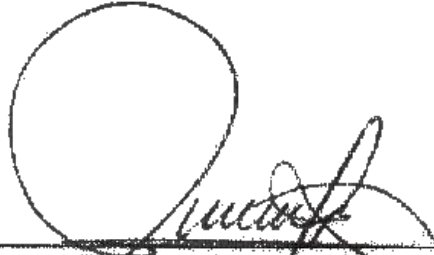
**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
DE ORIGEN ANIMAL**

Como requisito parcial para obtener el grado de

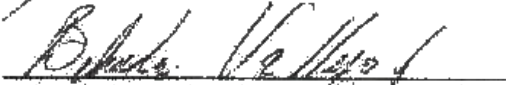
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

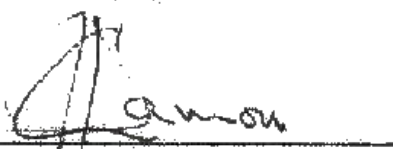
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de José Daniel Wicochea Rodríguez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias



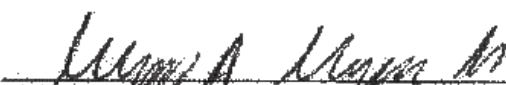
Dr. Aarón Fernando González Cordeva  
Director de Tesis



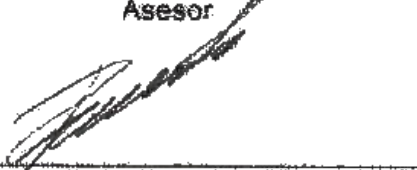
Dra. Belinda Vallejo Galland  
Asesor



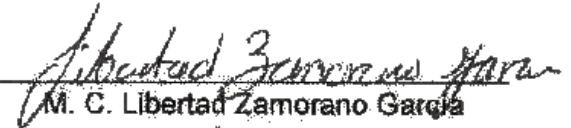
Dr. Juan Pedro Camou Arriola  
Asesor



Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano  
Asesor



Dr. Roberto Rodríguez Ramírez  
Asesor



M. C. Libertad Zamorano García  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante la realización del posgrado.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C** por la oportunidad de realizar mis estudios en su programa de maestría.

A mi Director de Tesis, el **Dr. Aarón Fernando González Córdova** por darme la oportunidad de integrarme al mundo de la investigación y guiarme durante la formación como estudiante. Su apoyo, confianza y paciencia fueron fundamentales.

A mis asesores **Dra. Belinda Vallejo Galland, M. en C. Libertad Zamorano García, Dr. Miguel Ángel Mazorra Manzano, Dr. Roberto Rodríguez Ramírez** y el **Dr. Juan Pedro Camou Arriola** por su apoyo y conocimientos brindados en el desarrollo y culminación de todo el presente estudio.

Al **Dr. Cesare Camma y Dr. Marco Di Domenico** por su apoyo técnico y conocimientos brindados durante la estancia de investigación en el Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "Giuseppe Caporale".

A la Coordinación de Posgrado de CIAD por el apoyo económico brindado para cumplir con los gastos necesarios que implican realizar una estancia de investigación en el extranjero

Al **IQ. Luis Germán Cumplido Barbetia** por su apoyo técnico en los trabajos realizados en planta piloto de productos cárnicos. Al **Dr. Adrián Hernández Mendoza, M. en C. Ricardo Reyes Díaz y M. en C. Carmen Estrada** por el apoyo técnico y la revisión y el asesoramiento para la culminación del manuscrito de tesis.

A mis compañeros **MVZ. Christian Gómez Pineda, IBQ. Isidro Méndez Romero, M. en C. Eleazar Aguilar Toalá, IQ. Luisana Guirado Obana e Ing. Wendy Lizárraga Mata** por el apoyo técnico y profesional brindado en el transcurso de este posgrado.

## DEDICATORIA

*A mi madre María del Socorro Wicochea Rodríguez, mi tía María Jesús y mi hermano Jesús Pablo que siempre me apoyaron moralmente y económicamente, gracias infinitas.*

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Carne y productos cárnicos bajo la denominación Jamón.....	4
2.2 Autenticidad en alimentos.....	5
2.3 Fraudes y adulteración en alimentos en México y el mundo....	7
2.4 Norma mexicana establecida para definir y regular al jamón.....	12
2.5 Técnicas analíticas utilizadas en el mundo para revelar la adulteración de los productos cárnicos.....	14
2.5.1 PCR en punto final.....	16
2.5.2 PCR en tiempo real (qPCR).....	17
2.6 Apliaciones de la qPCR en alimentos	21
3. HIPÓTESIS.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1 Desarrollo del sistema qPCR.....	27
5.1.1 Extracción de ADN y preparación de muestras.....	27
5.1.2 Desarrollo de un Control de Amplificación Interno (IAC).....	30
5.1.3 Prueba de reactividad cruzada.....	32
5.1.4 Desarrollo de curvas estándar a partir de ADN extraído de carne cruda de cerdo y pavo.....	33
5.1.5 Optimización de cebadores y sondas.....	35
5.1.6 Desarrollo de una curva estándar dúplex de ADN a partir de mezclas de ADN sometido a tratamiento térmico.....	37
5.1.7 Elaboración de mezclas cárnicas y estándares de jamón.....	39
5.1.8 Detección y cuantificación de ADN en mezclas cárnicas de composición conocida y estándares de jamones.....	45
5.2 Validación del sistema qPCR.....	48

## CONTENIDO (continuación)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
6.1 Extracción de ADN para homogeneizados sometidos a tratamiento térmico.....	49
6.2 Implementación de un control de amplificación interno.....	52
6.3 Eficiencia en las curvas estándar.....	55
6.4 Curva estándar dúplex para mezclas cárnicas sometidas a tratamiento térmico.....	65
6.5 Prueba de reactividad cruzada.....	71
6.6 Detección y cuantificación de ADN de mezclas cárnicas de Composición conocida y estándares de jamones.....	75
6.7 Validación del sistema qPCR, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).....	82
7. CONCLUSIONES.....	84
8. REFERENCIAS.....	85

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		<b>Página</b>
1	Curva típica de amplificación de qPCR.....	20
2	Método de extracción y purificación de DNA utilizando el kit Wizard Genomic DNA® adaptado a muestras empleadas....	29
3	Toma de muestra de jamón elaborado en Planta Piloto.....	44
4	Diluciones seriadas del control de amplificación interno.....	54
5	Prueba de especificidad de cebadores y sondas de hidrólisis para cerdo.....	58
6	Prueba de especificidad de cebadores y sondas de hidrólisis para pavo.....	59
7	Curva estándar de cerdo a partir de carne cruda.....	60
8	Curva de amplificación para cerdo a partir de carne cruda....	61
9	Curva estándar para pavo a partir de carne cruda.....	67
10	Curva de amplificación para pavo a partir de carne cruda.....	68
11	Curva estándar dúplex para cerdo.....	69
12	Curva estándar dúplex para pavo.....	73
13	Curva de amplificación del estándar dúplex.....	74



## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Resultados del análisis de hamburguesas (FSAI, 2013).....	9
2	Productos cárnicos adulterados con carne no declarada en Turquía en 2006.....	11
3	Secuencia del Control de Amplificación Interno y su sonda de hidrólisis.....	31
4	Diluciones empleadas para la curva estándar a partir de ADN de carne cruda de cerdo y pavo.....	34
5	Cebadores y sondas de hidrólisis empleados.....	36
6	Diluciones y concentraciones de ADN empleadas para la curva estándar dúplex a partir de ADN de cerdo y pavo sometido a tratamiento térmico.....	38
7	Mezclas de homogeneizados de carne de cerdo y pavo sometidos a tratamiento térmico.....	40
8	Lista de ingredientes (%) utilizados en la elaboración de jamones.....	41
9	Composición cárnica de los jamones elaborados en planta piloto.....	42
10	Código de jamones comerciales y especies animales declaradas en la etiqueta del producto.....	46
11	Mezclas de reacciones qPCR.....	47
12	Concentración de ADN de homogeneizados de cerdo y pavo medida por espectrofotometría y fluorescencia.....	50
13	Pendiente, eficiencia y $R^2$ de los ensayos qPCR a partir de carne cruda.....	57
14	Relación de los valores Umbral de Ciclo(Ct) con el contenido de ADN en curva de calibración de carne de cerdo cruda.....	62
15	Relación de los valores Ct con el contenido de ADN en curva de calibración de carne de pavo cruda.....	63
16	Valores Ct de la curva estándar dúplex con ADN de cerdo y pavo sometido a tratamiento térmico.....	70
17	Valores Ct y cantidad medida de las mezclas cárnicas.....	76
18	Cantidad medida de ADN por el sistema qPCR y valores Ct de jamones comerciales.....	77
19	Cantidad medida y valores Ct para jamones elaborados en Planta Piloto.....	78

## RESUMEN

En México la NOM-158-SCFI-2003 especifica la denominación y clasificación para el jamón que se produce y/o comercializa dentro del territorio nacional. La NOM establece una técnica para la detección de especie cárnica basado en el método de ELISA pero carece de una para la cuantificación de las proporciones de cerdo y pavo en los jamones. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), ha sido ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de ADN de especies en alimentos que son sometidos a tratamientos térmicos, coadyuvando así a evitar prácticas de adulteración. Sin embargo, aún no se cuentan con un protocolo basado en esta técnica, que se utilice para la identificación y cuantificación simultánea de cerdo y pavo en jamones. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo qPCR como propuesta a utilizarse en la verificación del cumplimiento de la NOM-158-SCFI-2003. La concentración adecuada para cebadores y sondas específicos fue determinada para cada especie (900 nM y 250 nM, respectivamente) obteniéndose una eficiente amplificación simultánea de ADN de cerdo y pavo en una misma reacción mediante qPCR. El rango de eficiencia en amplificación obtenido mediante la construcción de una curva estándar dúplex fue del 90 al 110%. Además, mediante las condiciones establecidas, se logró identificar y cuantificar simultáneamente la presencia de ambas especies en mezclas cárnicas sometidas a tratamiento térmico de 72 °C/10 min (jamones modelo) y en jamones comerciales. El límite de detección (25 pg de ADN para cerdo y 2.5 ng de ADN para pavo), límite de cuantificación (250 pg de ADN para ambas especies) y la validación del sistema qPCR fueron determinados.

**Palabras clave:** jamón, qPCR, cerdo, pavo

## ABSTRACT

In Mexico, NOM-158-SCFI-2003 specifies the designation and classification for the meat products that are commercialized inside the country. The NOM establish an inadequate technique for the detection of the animal species involved, and it lacks of one for the quantification of meat proportions of swine and turkey in a ham. Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) has been employed for the identification and quantification of DNA from species involved in foodstuffs submitted to thermal treatment, therefore, a helping technique to prove food adulteration. Even so, there is not yet a protocol based on this technique, where the identification and quantification of swine and turkey is used in a simultaneous way in hams. The objective of this research project was to develop a qPCR protocol aimed to fit in the NOM. Optimal primer and probe concentration was determined (900 nM and 250 nM respectively) to reach an efficient amplification between the ranks of 90 to 110% in a duplex standard curve. With the established conditions, simultaneous identification and quantification of DNA from swine and turkey in meat mixtures with thermal treatment (72 °C/10 min), manufactured hams (pilot plant), and commercial samples were achieved. The limit of detection (25 ng of DNA for pork and 2.5 ng of DNA for turkey), limit of quantification (250 ng of DNA for both species), and system validation were developed.

**Keywords:** ham, qPCR, swine, turkey

## I. INTRODUCCIÓN

La carne y los productos cárnicos poseen componentes nutritivos que son esenciales en la dieta. Proveen niveles importantes de proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales de gran importancia para el desarrollo y funcionamiento óptimo del organismo (Herrero *et al.*, 2013). Hoy en día los consumidores se preocupan sobre el tipo de carne que consumen, así por ejemplo, el estilo de vida de un individuo influye en la elección de los productos cárnicos en el mercado; el vegetarianismo, el consumo de productos orgánicos, la religión (*e.g.* ausencia de puerco en algunas dietas), dietas y preocupaciones en la salud (*e.g.* ausencia de alérgenos) (Ballin, 2010). Las razones anteriormente mencionadas sustentan el hecho de realizar un etiquetado preciso y exacto, asimismo apoyan al comercio justo entre productores.

La adulteración de los alimentos ocurre al momento de sustituir una especie de alto valor comercial, por otra de inferior valor dentro del producto alimenticio. La práctica anterior y la incorporación de otras especies en el producto sin ser mencionado en la etiqueta del alimento hacen que el alimento no sea auténtico. Así, un alimento auténtico de origen animal o vegetal, puede generalmente definirse como un “alimento fiable, confiable, de origen no refutable y genuino”. Determinar la identificación fiable de las especies animales es un elemento clave para la autenticidad de los alimentos y ésta se debe basar en parámetros precisos, confiables e invariables ante el procesamiento de los alimentos (Luthy, 1999).

En México, el jamón es uno de los embutidos más populares en el mercado y se comercializa en diferentes presentaciones, según su composición: cerdo (*Sus scrofa domesticus*), pavo (*Meleagris gallopavo*) y mezcla de ambas especies. El jamón está regulado por la Norma Oficial Mexicana NOM-158-SCFI-2003, la cual establece cómo deberán ser denominados y anunciados en su empaque, así como las especificaciones que deben cumplir para su procesamiento. La NOM también ofrece métodos de prueba aplicables para la verificación de los jamones y la técnica propuesta para identificación de especies es un Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) (NOM-158-SCFI-2003; PROFECO, 2013).

ELISA es la técnica que, alrededor del mundo, más se ha utilizado para fines regulatorios para determinar la autenticidad de un alimento, esto por su especificidad, simplicidad y sensibilidad (Asensio *et al.*, 2008). Sin embargo, existen algunas limitaciones en su uso: la desnaturalización de algunas proteínas inmunogénicas expuestas a altas temperaturas durante la producción del alimento (Dooley *et al.*, 2004), la presencia de proteínas que dependen del tipo de tejido y que no hay posibilidad de discriminación entre carne de aves de corral (e.g., pavo/pollo) (Zhang, 2007). Además, los anticuerpos policlonales presentan con frecuencia reacciones cruzadas frente a proteínas que son distintas a su blanco. Por ello, es necesario utilizar técnicas de purificación por cromatografía de afinidad o neutralización para la eliminación de las reacciones inespecíficas, haciendo exhaustiva la preparación de la muestra. Por lo anterior puede resultar no viable el utilizar ELISA en ciertos casos para probar la autenticidad de alimentos.

Por otra parte, existen metodologías basadas en el análisis del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), las cuales son más precisas debido a que la molécula de ADN presenta una alta estabilidad al tratamiento térmico, está presente en la mayoría de las células y presenta secuencias específicas para cada especie. Por ejemplo, una técnica muy eficiente y que se ha ido utilizando cada vez más para la autenticidad en alimentos mediante la identificación y

cuantificación de especies es la reacción de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (qPCR). Esta técnica combina la química de la Reacción en Cadena de la Polímerasa (PCR tradicional) con reactivos fluorescentes y/o sondas de detección en un producto amplificado, todo en el mismo tubo de reacción y detección de la amplificación en tiempo real (Herrero *et al.*, 2013). Distintos autores han reportado que la utilización de sondas de hidrólisis fluorescentes (TaqMan®) es un método lo suficientemente sensible y rápido para la identificación de especies en una mezcla. Además, no requiere el manejo de los productos PCR post-amplificación, por lo que se reduce el riesgo de contaminación de la muestra (Cammà *et al.*, 2012).

Frente a las raciones qPCR sencillas, las reacciones qPCR múltiple ofrece las ventajas de disminuir el costo de ensayo y gastos de reactivo, acoplado con una característica de ahorrar tiempo y han ido incrementando su relevancia en los últimos años (Iwobi *et al.*, 2015; Koppel *et al.*, 2008; 2011). El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un protocolo analítico por qPCR para la cuantificación y detección de manera simultánea de ADN cerdo y pavo en jamones.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Carne y Productos Cárnicos Bajo la Denominación Jamón

La carne es el producto pecuario de mayor valor, principalmente por su alto contenido en proteínas. Asimismo es un alimento rico en minerales, grasas, vitaminas y otros componentes bioactivos. Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne es debido a sus proteínas de alta calidad, ya que contiene todos los aminoácidos esenciales considerándola como una fuente “premium” de proteína. Además de comprometer una proporción significativa del consumo de proteína, el apreciado sabor y olor de la misma, la hace altamente consumida a nivel mundial (Iwobi *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2014; Weiss *et al.*, 2010; FAO 2013).

La Norma Oficial Mexicana denomina al “jamón” o “jamón de pierna” a aquel producto elaborado exclusivamente con la carne de las piernas traseras de cerdo el cual es declarado para el consumo humano por la autoridad responsable de acuerdo con los criterios y especificaciones generales establecidas. Sin embargo, México permite la incorporación de carne de otra especie (pavo) en la elaboración del jamón. Está permitido que se comercialicen jamones que no son de carne de cerdo, pero estos se denominan “jamón de pavo”, el cual deberá ser elaborado exclusivamente con la carne de los muslos del pavo declarados aptos para el consumo humano por la autoridad responsable. Los distintos productos se comercializan en diferentes presentaciones, según su composición sea de cerdo, pavo o una mezcla de ambos. Si el jamón es una mezcla de ambas especies, se deberá de especificar qué especie se encuentra en mayor proporción, por ejemplo: “jamón pavo-

cerdo” si contiene mayor del 55% de carne de pavo dicho producto y el resto será carne de cerdo (NOM-158-SCFI-2003).

Aunque el término “jamón” hace referencia a carne proveniente de la pierna, éste producto también puede involucrar carne de otro corte, seguido de un proceso de inyección de salmuera, masajeo y tratamiento térmico. Además, en algunos países como México, se utilizan diversos tipos de carne animal, la cual es añadida en menores cantidades. También, el término jamón de pavo es legalmente aceptado siempre y cuando la carne provenga de la pechuga o la pierna del ave. La producción y comercialización del jamón hecho particularmente de cerdo, pavo y aves de corral está incrementando significativamente día con día debido a la gran demanda por la industria y consumidores (Iqbal *et al.*, 2014).

## 2.2. Autenticidad en Alimentos

De acuerdo con la Unión Europea (European Commission, 2002), la trazabilidad o rastreabilidad se define como la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un alimento, pienso o animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinada a ser incorporada en alimentos o piensos, o con probabilidad de serlo.

La autenticidad se define como aquello que es confiable fidedigno y genuino. En el caso de la carne, la confiable identificación de las especies es el punto de partida para la autenticación de los productos cárnicos y deberá estar basada en parámetros que no sufran alteraciones severas durante el procesamiento de los mismos (González-Córdova *et al.*, 2007; Lüthy, 1999). Garantizar la autenticidad de algún producto cárnico es esencial al momento de implantar sistemas de trazabilidad en la industria alimentaria. Para establecer la



autenticidad de un alimento es necesario demostrar que éste se comercializa bajo la denominación a la que realmente corresponde, así como el contenido de materias primas y los porcentajes de ingredientes que se declaran en el etiquetado (Fajardo *et al.*, 2010).

El falso etiquetado puede llevar a implicaciones legales en muchos países, puede ser potencialmente dañino, penaliza el comercio justo, menosprecia la decisión del consumidor y el costo de su adquisición. La autenticidad de los alimentos y su trazabilidad son primeramente determinados por documentación y auditorías, aunque esto puede ser relativamente difícil y consumistas de tiempo, principalmente con alimentos importados. Por ello, en muchos de los casos, la verificación de la composición, origen y procesamiento del alimento puede ser más eficiente llevada a cabo por métodos analíticos (Woolfe *et al.*, 2013).

La autenticidad de los alimentos es un asunto de alta importancia para los investigadores, consumidores, industrias y los organismos oficiales de regulación y control de calidad en todos los procesos de producción de alimentos. Particularmente en la industria cárnica, los productos cárnicos son susceptibles al fraude debido a las repercusiones económicas favorables para el productor que se dan al momento de sustituir carne de una especie de alto valor comercial por otra de inferior valor (Fajardo *et al.*, 2010).

Uno de los retos analíticos más fuertes en la autenticidad de alimentos es cuantificar y detectar la adulteración en los productos cárnicos. La presencia de adulteración en el sentido de encontrar alguna especie animal no declarada en la etiqueta en productos cárnicos se puede detectar por medio de un análisis de proteína o de ADN (Ballin *et al.*, 2009); incluso la diferenciación entre razas de animales también puede ser identificada con un análisis de ADN (Kaupe *et al.*, 2004)

### 2.3. Fraudes y Adulteración en Alimentos en México y el Mundo

De acuerdo al Código Penal Federal mexicano, en su última reforma publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de Junio de 2013, define como fraude: cuando se engaña a algún individuo aprovechándose del error en el que éste se halla, se hace ilícitamente de alguna cosa o alcanza un lucro indebido. El fraude se realiza mediante una acción u omisión. En el primer supuesto, un individuo obtiene un beneficio económico a través de actos, realizados con total intención, al grado de conducir a la víctima al engaño. El fraude por omisión implica el aprovecharse del error y/o ignorancia de una persona, estar consciente del fraude y no hacer nada al respecto, además de recibir un beneficio. Tanto el fraude por acción como el de omisión, son conductas delictivas y están penadas, sin embargo la gravedad del fraude por acción es mayor debido a la evidente acción intencional del sujeto activo. El fraude a la ley radica en evitar la aplicación de una norma imperativa (Código Penal Federal, 2014).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés) define a un alimento adulterado como aquel que ha sido modificado por el hombre, alterando sus características por la extracción o sustitución de alguno de sus componentes.

El incremento de la importancia y el alto valor comercial de carnes comerciales y exóticas en muchas partes del mundo, junto con las prácticas frecuentes de cometer fraude o adulterar un producto en este nivel, está direccionando a los organismos regulatorios y a profesionales en el campo de la analítica de alimentos a desarrollar herramientas apropiadas para la autenticación de un gran número de especies animales (La Neve *et al.*, 2008).

Uno de los casos más recientes de fraude en autenticidad de alimentos a nivel mundial fue reportado el 15 de enero de 2013, cuando salió a la luz pública el hallazgo de carne de caballo (ADN) en hamburguesas de res

congeladas en varios supermercados de Irlanda y de Gran Bretaña. Esto comenzó por investigaciones que la Autoridad de Seguridad Alimentaria de Irlanda (FSAI por sus siglas en inglés) realizó en ese país, siendo el primer país de la Unión Europea en reportar públicamente la presencia de carne de caballo en productos que se ostentaban como carne de res. En base a los análisis realizados a distintos productos comerciales que estaban etiquetados como hamburguesas con contenido 100% carne de res; los resultados fueron a) 23 de 27 productos resultaron positivos a carne de cerdo, b) 10 de 27 productos obtuvieron positivo a carne de caballo (FSAI, 2013). Aunque la carne de caballo no sea dañina para la salud es considerada una conducta moralmente inaceptable en muchos países, incluyendo el Reino Unido e Irlanda. En la Tabla 1 se muestran las características de algunos productos evaluados y los resultados obtenidos por dicha agencia (FSAI) a principios de 2013..

Hoy en día la FSAI y los demás organismos regulatorios europeos han reforzado su investigación en las metodologías para detectar y cuantificar la especie animal en productos cárnicos, así como establecer programas para monitorear los productos en el mercado. El 16 de abril de 2013 el FSAI reportó que, de los 50 productos muestreados en el mercado europeo, que reportaban en la etiqueta no contener carne de caballo, obtuvieron resultados la ausencia de carne de ésta especie; pese a que en marzo de 2013 aún habían resultado positivos (FSAI, 2013; Premanandh, 2013).

Tabla 1. Resultados del Análisis de adulteración de Hamburguesas de res con especies porcina y equina (FSAI, 2013)

Nombre del producto	Comerciante	Marca	Contenido de carne de res listado en la etiqueta (%)	ADN porcino	ADN equino
Beef Burger	FXB Butchers	n/d	80-85	Positivo	Negativo
Nature's Isle 100% Irish Homestyle Beef Burgers	Aldi	Nature's Isle	95	Positivo	Negativo
Spar Beef Burgers	Spar	n/d	81	Positivo	Negativo
Iceland Beef Burgers	Iceland	n/d	79	Negativo	Negativo
Centra Beef Burgers	Centra	n/d	80	Positivo	Negativo
Tesco Everyday Value Beef Burgers	Tesco	n/d	63	Positivo	Positivo
Oakhurst Beef Burgers	Aldi	Oakhurst	78	Positivo	Positivo
St. Bernard Beef Burgers	Dunnes Stores	n/d	63	Positivo	Positivo
Moordale Beef Burgers	Lidl	Moordale	81	Positivo	Positivo
Supervalu Quarter Pounder Beef Burgers	Supervalu	n/d	95	Positivo	Negativo

FSAI, (2013)

Otros ejemplos de fraudes en productos cárnicos se han reportado en países como Brasil, Estados Unidos de América, Turquía, Suiza, El Reino Unido y México (Ballin, 2010).

La legislación en Brasil permite la incorporación de un máximo de 7.5% de proteína de soya en hamburguesas. Macedo-Silva y colaboradores (2001) encontraron en hamburguesas comerciales de cerdo, res (*Bos taurus*) y pollo (*Gallus gallus domesticus*) y el 30.8 % de los productos analizados (39 en total) contenían más de la cantidad de proteína de soya permitida.

En Turquía se encontró carne de especies no declaradas en productos cárnicos como salchichas fermentadas (salami, salchicha tipo frnakfurt), también en carne cruda, carne molida, jamón, tocino y carne enlatada. Se analizaron un total de 100 muestras del mercado, de las cuales 22 revelaron carne no declarada de ciervo (*Cervus elaphus*), caballo (*Equus ferus caballus*) y aves de corral (pavo, pollo, pato (*Anas platyrhynchos domesticus*) y ganso (*Anser anser domesticus*) en el etiquetado de las muestras. La Tabla 2 muestra los productos que fueron encontrados estar adulterados con caballo, ciervo y aves de corral en productos cárnicos comercializados en Turquía (Ayaz *et al.* 2006). Dichas muestras estaban declaradas en ser 100% carne de resy el ELISA utilizado para la identificación no discrimina carne de aves de corral.

En México, Flores-Munguía *et al.*, (2000) encontraron mediante un ELISA, carne de especies no declaradas en la etiqueta de productos cárnicos. Los productos del mercado analizados fueron salchichas Mexicanas (chorizo) y hamburguesas sin cocinarse. Carne de caballo no declarada fue detectada en 9 de 23 muestras de hamburguesa y en la salchicha Mexicana (chorizo) se encontró carne no declarada de caballo y de cerdo en 5 de 17 muestras González-Córdova *et al.*, (1998) desarrollaron un ensayo ELISA para la detección y cuantificación de soya no declarada en la etiqueta de chorizos comerciales, encontrando productos que contenían entre 30 y 40% de soya (González-Córdova *et al.*, 1998).

Tabla 2. Productos cárnicos adulterados con carne no declarada en Turquía en 2006

Producto	Total de muestras	Muestras adulteradas	Especie utilizada para la adulteración
Salchichas fermentadas	28	11	Ave de corral
Salami cocido	14	5	Ave de corral
Salchicha tipo Frankfurt	11	3	Ave de corral
Carne cruda	9	2	Caballo y ciervo
Carne picada	16	1	Ave de corral

(Ayaz *et al.*, 2006)

#### 2.4. Norma Mexicana Establecida Para Definir y Regular al Jamón

En Mexico, La Dirección General de Normas (DGN) es un departamento de la Secretaría de Economía (SE) y es el responsable de crear las Normas Oficiales Mexicanas (NOMs). Éstas proporcionan información detallada y bajo un formato la documentación que se debe mantener para el cumplimiento de la ley y su reglamentación; también detallan los fines o propósitos de la norma y sus sanciones (DOF, 2013; SE, 2013). El formato presentado en las NOMs se interpreta de la siguiente manera: primeramente el indicador de Norma (NOM), seguido se encuentra el número de la misma, posteriormente la abreviación del departamento gubernamental, y por último el año en el que se emite para efecto de cumplimiento. Como ejemplo la NOM-158-SCFI-2003, Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba.

La NOM-158-SCFI-2003 establece las denominaciones y clasificaciones comerciales de los diferentes tipos de “Jamón”, que se comercializan dentro del territorio de los Estados Unidos Mexicanos, así como las especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas que deben reunir estos productos para ostentar dichas denominaciones así como los métodos de prueba para demostrar su cumplimiento y la información comercial que deben contener los envases que los contienen. Centrando la atención en las definiciones de “Jamón”, según la norma, este es un producto elaborado exclusivamente con la carne de las piernas traseras del cerdo (*Sus scrofa domestica*), declarados aptos para el consumo humano por la autoridad responsable, de acuerdo con los criterios y especificaciones generales que se establecen en la norma; sin embargo también se permite la denominación de “Jamón de pavo,” que se define como un producto alimenticio, elaborado exclusivamente con la carne de los muslos del pavo, declarados aptos para el consumo humano por la autoridad responsable, de la especie (*Meliagris*

gallopavo), de acuerdo con los criterios y especificaciones generales que se establecen en el cuerpo de la Norma.

La norma también posee desambiguaciones y establece que “carne” es la *“estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos de las especies animales autorizadas para el consumo humano, que no han sido sometidas a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características organolépticas y fisicoquímicas. “Pierna de cerdo” es la región de las extremidades posteriores (piernas traseras), conformada por cualquiera de las masas musculares cuya base ósea es el extremo anterior del pubis y la totalidad de los huesos denominados fémur, tibia y peroné. La parte superior de esta región limita con las vértebras caudales, la anterior con los músculos rectos del abdomen y en la parte inferior con la articulación tibio-tarsiana. “Muslo de pavo” es la parte de la pierna del pavo desde la juntura de la cadera hasta la rodilla (articulaciones coxo-femoral y femoral-tibio-rotuliana)”*.

La Norma establece específicamente que un Jamón de Cerdo y Pavo comercial debe contener como mínimo 55% de carne de cerdo y el resto con carne de pavo, y un Jamón de Pavo y Cerdo deberá estar elaborado con un mínimo de 55% de carne de pavo y el resto con carne de cerdo. La técnica sugerida por esta Norma para determinar la especie animal en el producto es por medio de un ELISA y no sugiere alguna técnica para cuantificar el contenido de carne de especies, además la incorporación de carne mecánicamente deshuesada está permitida por dicha norma. El hecho anterior facilita incorporar carne de otras especies ya que la metodología mencionada por la norma se basa en un ensayo de proteína y no puede detectar ni cuantificar cartílago u otro tejido removido por el proceso.

La técnica ELISA posee limitaciones como una afinidad muy variada, producción limitada y requiere procedimientos de purificación extensiva para eliminar la reactividad cruzada en cuanto a la identificación de especies se



refiere. Otra limitación muy grande de esta metodología es cuando se tiene como blanco una proteína; esto se debe a que las proteínas se desnaturalizan en el proceso de la elaboración del producto y por lo tanto el sitio activo o reconocimiento de la proteína no estará presente en una condición detectable por los anticuerpos (Asensio *et al.*, 2008). Las limitantes mencionadas anteriormente son algunos hechos que pueden favorecer a los productores de alimentos cárnicos térmicamente procesados, ya que pueden utilizarse como argumentos científicos para defender su posición si son acusados de fraude, se haya o no cometido. Es por ello que los organismos regulatorios oficiales necesitan implementar nuevas técnicas más específicas, sensibles y exactas para la identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios.

## 2.5. Técnicas Analíticas Utilizadas en el Mundo Para Revelar la Adulteración de los Productos Cárnicos

Algunos países han adaptado nuevas técnicas para evidenciar fraudes y verificar la autenticidad de los productos cárnicos. Las técnicas analíticas que se utilizan actualmente están basadas mayormente en análisis de ADN o de proteínas (Ballin *et al.*, 2009); sin embargo, para fines de detección y cuantificación de especies, las técnicas de PCR en tiempo real están ganando popularidad en países de la Unión Europea. Por ejemplo, la Unión Europea posee métodos de referencia para la detección de ADN de caballo utilizando qPCR y kits de calibración para la detección de rumiantes por PCR (EURL, 2014). Además Suiza es uno de los países en el cual sus laboratorios oficiales de control de calidad y procesamiento ya han establecido protocolos para la detección y cuantificación de especies como caballo, cerdo, oveja, res, pollo, pavo y cabra en matrices cárnicas (Koppel *et al.*, 2009; 2007).

Es evidente que la detección y cuantificación de especies en productos cárnicos debe ser implementada con metodologías de vanguardia para que las leyes en cada país cuenten con herramientas de inspección precisas que garanticen el cumplimiento de las especificaciones legales en el mercado de alimentos procesados.

Existen diversos métodos analíticos utilizados para la autenticación de carne y productos cárnicos. Los métodos analíticos incluyen la Reacción en Cadena de la Polimerasa, cromatografía, espectrometría de masas, microscopía, espectroscopía, resonancia de espín electrónico y ensayos enzimáticos. Ballin (2010) realizó una revisión extensiva en técnicas analíticas utilizadas para la autenticidad de la carne y la sustitución de la misma en productos cárnicos. Sin embargo, una de las técnicas más utilizadas en términos generales ha sido la ELISA. González-Córdova *et al.*, (1998) utilizaron ELISA para encontrar la adulteración de chorizo de puerco con proteínas de soya, Flores-Munguía *et al.*, (2000) también la utilizaron para fines de revelar adulteración en hamburguesas y salchichas comerciales del territorio mexicano.

Otra técnica analítica utilizada en autenticidad de alimentos es la Electroforesis Capilar (EC). La EC es una técnica que combina tanto aspectos de electroforesis convencional como de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). La separación está basada en la migración diferencial bajo un campo eléctrico y ocurre en solución libre sin requerimiento de un gel. La detección se realiza conforme ocurre la separación generando señales detectables por absorbancia Ultra Violeta, fluorescencia o espectrometría de masas. Una ventaja importante de la técnica en la autenticidad de los productos cárnicos radica en que requiere cantidades pequeñas de muestra y soluciones amortiguadoras (González-Cordova *et al.*, 2007).

Técnicas moleculares como la PCR en punto final también ha sido utilizada para la detección de especies en los productos cárnicos, incluso acoplada a otras técnicas como la PCR-RFLP (Análisis de Amplificación de Fragmentos de Restricción Polimórficos) la cual consiste en la ampliación de fragmentos de

ADN específicos mediante PCR. El posterior tratamiento de los fragmentos amplificados involucra enzimas de restricción y las enzimas cortan el amplicon en fragmentos más pequeños. La técnica es mayormente utilizada para la diferenciación de especies cárnicas estrechamente relacionadas así como para monitorear la autenticidad de las especies cárnicas en productos alimenticios sometidos a diferentes procesos tecnológicos (Pascoal *et al.*, 2004; Wolf *et al.*, 1999).

Las técnicas más usadas para la autenticación de las especies cárnicas son las inmunológicas, electroforéticas y cromatográficas. El problema con las técnicas mencionadas en el enunciado anterior es la dificultad de detectar especies en productos cárnicos procesados térmicamente, por lo que las técnicas basadas en la detección del ADN en los alimentos, ha tomado gran importancia en la autenticación de los mismos (González-Cordova *et al.*, 2007).

### **2.5.1 PCR Punto Final**

Al momento de explorar métodos alternativos para la síntesis de secuencias específicas de ADN surge la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), que se introdujo en 1985 (Mullis *et al.* 1985). La técnica se ha ido modificando conforme el tiempo, aprovechando sus características peculiares de alta sensibilidad, especificidad y exactitud. El método consiste en ciclos repetitivos de la desnaturalización, hibridación y la extensión de la enzima polimerasa sobre la cadena de ADN. Con cada ciclo este proceso cataliza el doble de material genético definido por las posiciones del extremo 5' donde actúan los cebadores en la cadena de ADN patrón; el fragmento de ADN continúa incrementándose de manera exponencial y el proceso puede continuar por varios ciclos y además seguir siendo muy específico (Mullis *et al.*, 1986; Dorak, 2006).

La mezcla de reacción contiene dinucleótidos trifosfatados que servirán para formar la secuencia de la nueva cadena de ADN, cebadores específicos y complementarios a una de las dos hebras de ADN, cloruro de magnesio como cofactor de la polimerasa, solución buffer que ayuda a mantener un pH adecuado para la función óptima de la enzima polimerasa, Taq ADN polimerasa, agua deionizada estéril y por último el ADN molde (Alberts *et al.*, 2008).

Un termociclador es una herramienta utilizada en el campo de la biología molecular, este dispositivo se caracteriza por realizar cambios de temperaturas puntuales y rápidas sobre un tubo de reacción, necesarios para efectuar una reacción en cadena de la polimerasa y amplificar ADN. El tubo de reacción posee una mínima cantidad de muestra y los cambios de temperatura se realizan sin provocar fugas o evaporación en el sistema donde se lleva a cabo la reacción (Lucena *et al.*, 2013). Una vez culminada la reacción, los productos PCR se someten a un gel de agarosa o acrilamida. Posteriormente el gel se somete a una cámara de electroforesis con una solución buffer (generalmente se utiliza Tris Acetatos EDTA), un agente colorante (*e. g.* azul de bromofenol, SYBR Safe®) y, al aplicar corriente eléctrica y con respecto al tiempo, los productos PCR se separan de acuerdo al tamaño de cada uno. El gel se extrae de la cámara de electroforesis y se coloca en un fotodocumentador con una fuente de luz UV para revelar el tamaño de los fragmentos.

### **2.5.2. PCR en Tiempo Real (qPCR)**

Bustin *et al.* (2009) propusieron los lineamientos para la PCR cuantitativa o en tiempo real. Los lineamientos mencionados proponen referenciar a la PCR cuantitativa o en tiempo real como qPCR. La qPCR es una variante de la PCR

que consiste en la recuperación continua de una señal indicando fluorescencia a partir de una o más reacciones de la reacción en cadena de la polimerasa en un determinado rango de ciclos (Dorak, 2006). La qPCR se realiza en un termociclador acoplado a un detector de fluorescencia. Un fluorocromo (generalmente SYBR Green®) se añade a la mezcla de reacción y éste se intercala en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla a los ácidos nucleicos que la componen; al duplicarse la cadena de ADN se incrementa la emisión de la radiación electromagnética y se ve reflejada en el detector de fluorescencia con una señal. La qPCR es la conversión de estas señales de fluorescencia de cada reacción a un valor numérico para cada muestra (Soares *et al.*, 2013; Dorak, 2006).

Algunas de las ventajas de qPCR basada en fluorescencia son: a) el potencial de hacer mediciones cuantitativas en cualquier etapa del proceso, el cual es más preciso que los análisis tradicionales de PCR, b) la discriminación del origen del ADN sin la necesidad de pasos laboriosos como secuenciación o digestión enzimática, c) los datos obtenidos de la fluorescencia pueden ser interpretados directamente de un instrumento de PCR tiempo real o un espectrofotómetro de fluorescencia, evitando la necesidad de realizar un gel de electroforesis como lo requiere la PCR tiempo final, d) la rapidez de los ensayos, que permite establecer una rutina de trabajo y correr múltiples muestras y e) la reducción de la contaminación potencial de la mezcla de reacción con el ADN de interés debido a que los tubos de reacción permanecen cerrados durante todo el ensayo (Brodmann y Moore, 2003; Chisholm *et al.*, 2008).

Otra adaptación química de qPCR es la hidrólisis de sondas TaqMan® o sondas de hidrólisis (Bustin *et al.*, 2009). Las sondas se añaden a la mezcla de reacción en lugar del fluorocromo que se intercala en la cadena de ADN, éstas se componen por una cadena de unos cuantos nucleótidos en la cual en un

extremo está unido un fluorocromo y en el otro un extintor. La polimerasa también actúa como exonucleasa, de manera que las sondas son liberadas en cada ciclo. Estas sondas permiten el uso de amplicones muy pequeños y sondas internas que solamente se unirán a una secuencia específica dentro del mismo amplicón. Este tipo de análisis pueden amplificar el ADN de manera específica y eficiente (Fajardo *et al.*, 2010). La Figura 1 muestra una curva de amplificación típica de qPCR donde se observa el incremento de fluorescencia respecto a la cantidad de ciclos del sistema, también se indica el umbral de detección y la posición de los valores Umbral de Ciclo (Ct) El análisis también puede presentar posibles limitaciones como el diseño de cebadores y sondas, las cuales tienen que considerarse y realizarse bajo condiciones muy rígidas, lo cual no siempre es fácil (Jonker *et al.*, 2008; Laube *et al.*, 2007).

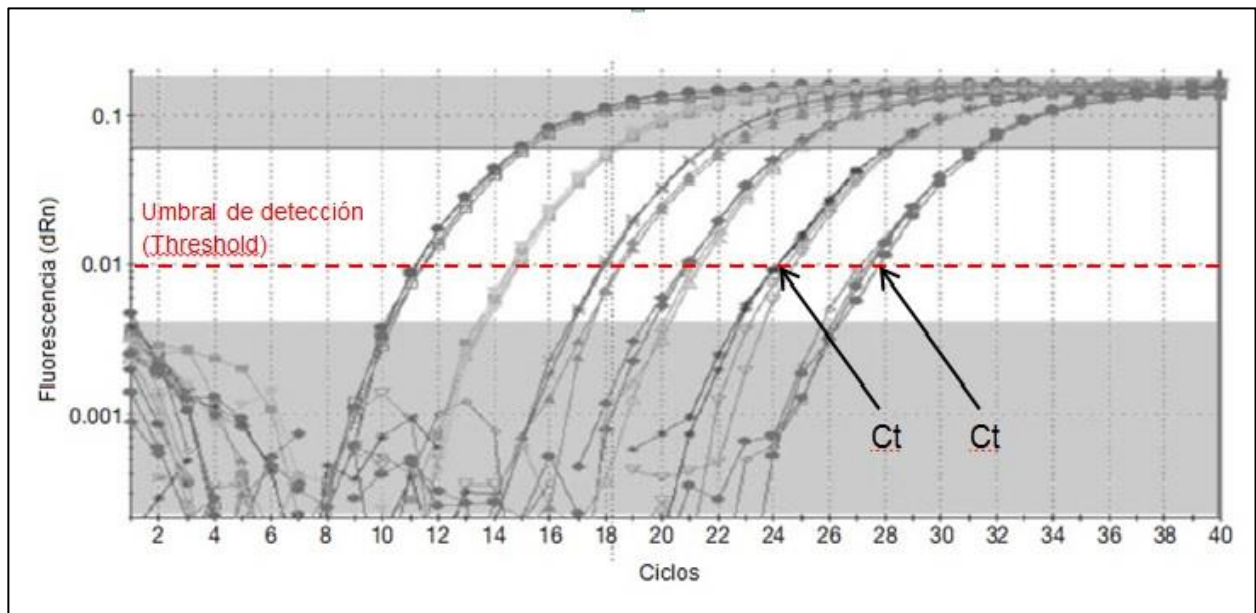


Figura 1. Curva típica de amplificación de qPCR.

dRn: Incremento de fluorescencia, Ct: ciclo en el cual se alcanza el umbral de detección. (Dorak, 2006).

## 2.6. Aplicaciones de la qPCR en Alimentos

La qPCR permite la detección de diferentes especies de animales a nivel traza, esto en los productos de alguna composición compleja y es una herramienta molecular considerada como la más prometedora en cuanto a la autenticidad de productos cárnicos (Koppel *et al.*, 2009).

En los últimos años, las técnicas o ensayos de qPCR se han ido describiendo y modificando para la detección de un gran número de especies animales que dan origen a productos cárnicos como res, cerdo, cordero, caballo, pollo, pato, pavo, entre otros (Koppel *et al.*, 2009; Jonker *et al.*, 2008; Chisholm *et al.*, 2005). Otros logros han sido identificar ADN de faisán y codorniz en productos alimenticios comerciales utilizando cebadores específicos de especies y sondas de hidrólisis designadas en el gen mitocondrial del citocromo b (Chisholm *et al.*, 2008), detección y cuantificación de cerdo en matrices cárnicas por sondas de hidrólisis que reconocen al gen 12S de ARN ribosomal del cerdo (Rodríguez *et al.*, 2005). Se logró también un análisis de qPCR con el fluoroforo SYBR Green para detectar carne de venado, gamo, corzo, rebeco y bucardo en productos cárnicos que contienen mezclas de distintos tipos de carne, utilizando cebadores específicos que tienen como objetivo reconocer los genes 12S de ARN ribosomal (Fajardo *et al.*, 2008a, 2008b).

Mientras que la detección de carne no declarada en las etiquetas de los productos alimenticios es una prueba relativamente sencilla, los problemas se presentan en la cuantificación. Existe una tendencia a enfocarse en el contenido de carne bajo la expresión de peso/peso (p/p). Por varias razones, las mediciones analíticas de ADN y proteína utilizadas en la cuantificación de las especies no son fácilmente correlacionadas al contenido de carne (p/p). El hecho de desconocer la composición de la muestra y su procedimiento en el



procesamiento de la misma contribuyen a los problemas al correlacionar los resultados analíticos con el contenido de carne (p/p) independientemente si los métodos de medición fueron basados en ADN o proteína (Ballin *et al.*, 2009).

Los principales problemas en cuantificación de adulteración son la composición del tejido, el tratamiento de la muestra y el procesamiento del producto que generalmente es desconocido para el investigador. Un gran número de publicaciones trata de cuantificar adulteraciones en p/p; se sugiere también utilizar cuantificación genoma/genoma para evitar complicaciones (Ballin *et al.*, 2009). Las ventajas generales que presenta la determinación de especies de una manera cualitativa qPCR son que si se utiliza ADN mitocondrial, éste se puede encontrar en la mayoría de las células y tiene un límite de detección bajo (facilitando la detección en productos cárnicos procesados térmicamente). La mayoría de los trabajos publicados se enfocan en cuantificar ADN mitocondrial. Al haber una cantidad desconocida de mitocondrias en las células a las que se extrae el ADN en la matriz cárnica, la cuantificación del mismo no será la misma en un duplicado. Una copia sencilla de ADN genómico ofrece facilidad para diseñar cebadores específicos y evitar reactividad cruzada, pero posee un alto límite de detección.

Para cuantificar las especies es necesario realizar estándares de calibración que permitan para convertir los datos genoma/genoma a p/p. Si se utiliza ADN mitocondrial se obtiene la ventaja de un bajo límite de detección, pero hay variaciones de este tipo de ADN muy grandes de un tejido a otro, por lo que es necesario conocer la composición del alimento en p/p y el tipo de tejido que se utilizó. Cuando se utiliza una sola copia de ADN genómico existe la ventaja de que se puede cuantificar en base a equivalentes de ADN si se mantiene un número constante de copias, pero hay un límite alto de detección (Koppel *et al.*, 2011; Ballin *et al.*, 2009).

La ventaja de utilizar ADN como muestra es que gracias a este, se puede diferenciar las especies de los animales y sus razas. Además el ADN posee una alta estabilidad térmica, se encuentra presente en la mayoría de las células y permite obtener información específica del animal, independientemente del origen del tejido que se tomó la muestra (Lockley y Bardsley, 2000).

El proceso de detección y cuantificación de especies en un producto cárnico consiste en extraer el ADN de la muestra, para ello existen kits comerciales que permiten llevar a cabo la purificación del material genético (e.g., Promega, Madison, EUA). Una vez extraído el ADN, se debe llevar a una concentración de ADN deseada para someterse al sistema qPCR. Se debe también diseñar los cebadores específicos y las sondas para el gen específico y deseado de la especie a analizar; existen herramientas para el diseño de los cebadores (e.g., AlleleID®, PrimerExpress®). Una vez establecido el protocolo de la reacción se añaden los tubos de reacción con cada uno de sus reactivos al termociclador y se procede con la reacción PCR con monitoreo de la amplificación por fluorescencia en tiempo real (Koppel *et al.*, 2011).

Es necesario medir la especificidad, exactitud y precisión para cada uno de los sistemas de PCR. La detección de especies se realiza añadiendo cebadores específicos para un gen de la especie de interés, si existen señales de amplificación indica que la especie está presente. Al momento de cuantificar las proporciones de peso por medio de mediciones de ADN, es necesario conocer la composición del producto como se ha venido mencionando a lo largo del presente trabajo.

Koppel *et al.* (2009), determinaron y cuantificaron cerdo y pavo en una matriz cárnica, además de tener otras especies como caballo, oveja, cabra, pollo y res, utilizando una qPCR múltiple. Los blancos fueron dirigidos a genes de ADN genómico, utilizando sondas y cebadores específicos. El sistema que

diseñaron obtuvo una sensibilidad razonable de 2% como mínimo de todas las especies y no hubo reactividad cruzada y concluyeron que el punto más difícil fue desarrollar la matriz cárnica. Sin embargo, la cuantificación de las proporciones de las matrices cárnicas sometidas al tratamiento térmico fue solamente estimada.

Otro estudio fue el de Cammà *et al.* (2012), donde desarrollaron y validaron un ensayo no multiplex de PCR en tiempo real para la identificación de especies pavo, pollo, res, cerdo, oveja en mezclas cárnicas cocidas. Los resultados de la sensibilidad y especificidad indicaron un buen desempeño y se consideró que el método a utilizar fue óptimo y práctico. En este trabajo se blanquearon genes de ADN mitocondrial y algo innovador fue el desarrollo de un Control de Amplificación Interno (IAC por sus siglas en inglés).

El IAC elaborado por Cammà *et al.* (2012), consiste en un oligonucleótido de cadena sencilla colocado en el tubo de reacción con el ADN y la mezcla de reacción para las muestras de interés. El IAC cuenta con una sonda de hidrólisis específica y utiliza los cebadores de algún otro blanco para su amplificación, ahorrando reactivos de la mezcla de reacción. El IAC debe amplificar en todo el ensayo que revela la inexistencia de inhibiciones en la muestra de interés y se puede realizar llevar a cabo en el mismo tubo de reacción (Cammà *et al.*, 2012; Laube *et al.*, 2007).

### III. HIPÓTESIS

La técnica qPCR múltiplex permite detectar y estimar de manera simultánea la proporción de las especies cárnicas presentes en jamones de acuerdo a la establecida por la NOM-158-SCFI-2003.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Desarrollar un protocolo analítico por qPCR para la detección y cuantificación de pavo y cerdo en jamones horneados.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración adecuada de cebadores y sondas específicas para cerdo y pavo con el fin de obtener una eficiencia en un rango de 90 a 110% en una curva estándar de qPCR.
- Desarrollar un sistema qPCR basado en una curva estándar dúplex de cuantificación de ADN de cerdo y pavo sometido al tratamiento térmico comúnmente utilizado en la preparación de jamones.
- Validar el sistema qPCR e implementar el mismo a jamones comerciales y elaborados en el laboratorio de acuerdo a la NOM-158-SCFI-2003.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Desarrollo del Sistema qPCR

#### 5.1.1. Extracción de ADN y Preparación de Muestras

Se utilizaron 50 g de carne magra de pierna de cerdo y 50 g de pechuga de pavo que se obtuvieron en un mercado local en Hermosillo, Sonora, México. Los 50 g de carne se homogeneizaron por separado en 150 mL de solución estéril de buffer PBS 10 mM pH 7.4 (PBS) en una licuadora Oster® durante 2 minutos (Cammà *et al.*, 2012). Los homogeneizados se colocaron en tubos Falcon® de 50 mL. Se separaron 2 tubos Falcon® con homogeneizado de cada especie y se sometieron a tratamiento térmico en un baño de agua hasta que la temperatura interna del homogeneizado alcanzó 72 °C y se mantuvo en esa temperatura por 10 minutos, esto con el objetivo de simular el tratamiento térmico que experimenta un jamón en su elaboración según las especificaciones de la NOM-158-SCFI-2003. Los homogeneizados se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Se colectaron 800 µL de cada homogeneizado y se colocaron en tubos Eppendorf® de 1.5 mL. Para la extracción y purificación del ADN se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA). La Figura 2

muestra un esquema de la extracción y purificación empleada para cada una de las muestras. El ADN purificado se diluyó con Solución de Elución Wizard® bajo las especificaciones del proveedor. Durante el procedimiento de extracción se utilizaron alcoholes 2-propanol y etanol grado biología molecular (SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, USA).

La concentración y pureza de las muestras de ADN extraídas se determinó registrando la Absorbancia a 260 nm y se estimó el cociente A260/A280 empleado en un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo™ Scientific 2000c, USA). Posteriormente se purificó y concentró el ADN extraído con el kit Expin® PCR SV (GeneAll®, Seoul, Korea) y el ADN pasó a ser nuevamente cuantificado por medio del kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) basado en análisis por fluorescencia). Las muestras de ADN extraído y purificado se almacenaron a -20 °C hasta su análisis

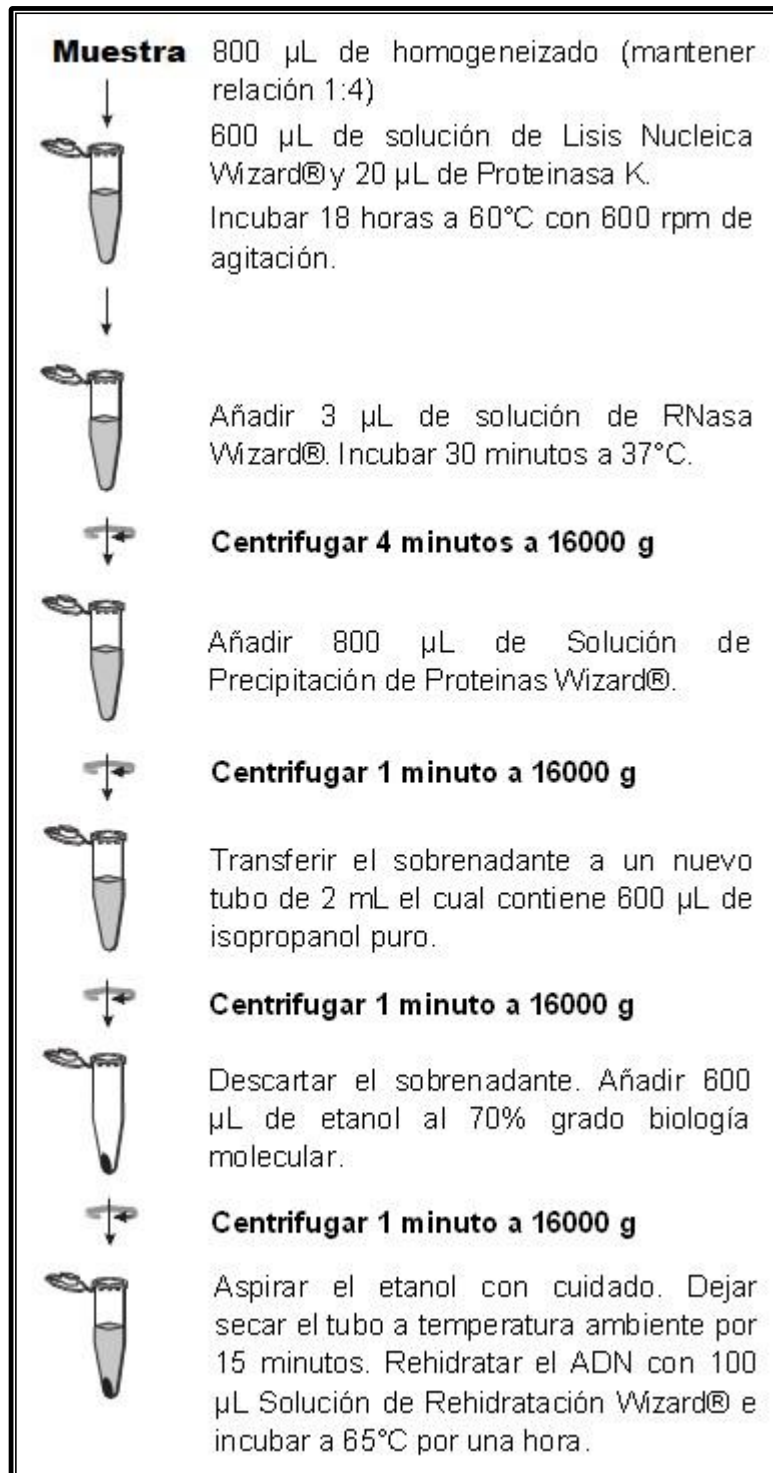


Figura 2. Método de extracción y purificación de DNA utilizando el kit Wizard Genomic DNA® adaptado a las muestras empleadas.



### **5.1.2. Desarrollo de un Control de Amplificación Interno**

Basándose en la metodología de Cammà *et al.* (2012), se desarrolló un Control de Amplificación Interno (IAC) el cual fue sintetizado por la casa comercial IDT (UNIPARTS, USA). La secuencia del oligonucleótido IAC y de la sonda utilizada para su amplificación se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia del Control de Amplificación Interno y su Sonda de hidrólisis.

IAC y Sonda	Secuencia	Fluoróforo/ extintor
IAC	CGAGAGGCTGCCGTAAAGGGGACGAACACCTA TTAGACATTCGTTCCATTGGTCGATGGAGCACTT AGCCGTGTTCCCTTGCA	
S_IAC	AACACCTATTAGACATTCGTTCCATTGGTCGA	JOE/BHQ1

IAC: oligonucléotido control de amplificación interno

S\_IAC: Sonda de hidrólisis para el control de amplificación interno.

### 5.1.3. Prueba de Reactividad Cruzada

Para todos los sistemas qPCR aplicados, la especificidad es un prerrequisito fundamental (Iwobi *et al.*, 2015; Koppel *et al.*, 2011). Aunque los cebadores y las sondas de hidrólisis utilizadas en este trabajo han sido reportados por otros investigadores con anterioridad, un ensayo exhaustivo de especificidad se llevó a cabo con otras especies animales cárnicas y vegetales. Para probar la especificidad de los cebadores y sondas de manera experimental, ADN de los siguientes organismos se aisló y se probaron en el sistema qPCR dúplex: caballo (*Equus ferus caballus*), ciervo (*Cervus elaphus*), soya (*Glycine max*), venado (*Cervidae*), jabalí (*Sus scrofa*), zorro (*Vulpini*), gamuza (*Rupicapra rupicapra*), lobo (*Canis lupus*), pollo (*Gallus gallus domesticus*), oveja (*Ovis orientalis aries*), cerdo (*Sus scrofa*), pavo (*Meleagris gallopavo*) y búfalo (*Bison bison*). El tejido de dichas especies fue aislado en y proporcionado por el laboratorio de *Ricerca e Sviluppo* del Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "Giuseppe Caporale" en Teramo, Italia.

La prueba de especificidad se realizó por duplicado para cada ADN de las especies mencionadas en la lista anterior, colocando en el tubo de reacción 15 µL de la mezcla de reacción conteniendo (2 X Fast Universal TaqMan® Master Mix con ROX como fluorescencia pasiva, agua libre de nucleasas, DNAasas y proteasas, cebadores y sondas de hidrólisis específicas para cerdo). La misma mezcla de reacción se realizó al momento de efectuar la prueba para el pavo, a diferencia de la sustitución de los cebadores y sondas de hidrólisis específicas de cerdo por pavo. La amplificación de alguna de las especies blanqueadas (sin incluir pavo y cerdo) indica reactividad cruzada, indicando que los cebadores y sondas utilizados no son específicos para las especies de principal interés.

#### 5.1.4. Desarrollo de Curvas Estándar a Partir de ADN extraído de carne cruda de cerdo y pavo

Las curvas se elaboraron siguiendo la metodología de Koppel *et al.* (2008) donde se utilizó como primer punto una concentración de 20 ng/  $\mu\text{L}$  de ADN y diluciones seriadas para los demás puntos de la curva. El análisis qPCR se llevó a cabo de manera individual por triplicado para el cerdo y el pavo en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción para cada punto de la curva. El volumen por reacción de la mezcla consistió en 10  $\mu\text{L}$  2X Universal Mastermix Fast con ROX como normalizador de fluorescencia (Applied Biosystems, USA), 0.16  $\mu\text{L}$  200 nM de cada sonda de hidrólisis TaqMan®, 0.16  $\mu\text{L}$  200 nM de cada cebador y 4.52  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas como diluyente. Una vez depositada la mezcla de reacción en los pocillos de la placa, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de ADN genómico con concentración de 20 ng/  $\mu\text{L}$  para un primer punto. Posteriormente se prepararon los demás puntos de la curva (4) con sus respectivas diluciones que se muestran en la Tabla 4. Los testigos positivos y negativos se amplificaron bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 20 s, y 40 ciclos de 95 °C por 3 s, 60 °C por 30 s en un termociclador de PCR tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems® Foster City, EUA )

A partir de los datos obtenidos de las pendientes de las curvas estándar se determinó la eficiencia de la qPCR múltiple mediante la ecuación 1.

$$E = (10^{1/\text{pendiente} - 1}) \times 100 \quad (1)$$

Se consideró una amplificación con 100 % de eficiencia cuando la pendiente tuvo un valor de -3.32, factor que estuvo relacionado con la exactitud del protocolo y que fue obtenido directamente del software del termociclador. Paralelamente, se evaluó la linealidad del método mediante el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) entre la cantidad de cerdo y pavo, y su correspondiente valor de Umbral de Ciclo (Ct), éste último se refiere al número de ciclo en el cual la fluorescencia generada con la reacción cruza el umbral de detección del equipo.

Tabla 4. Diluciones empleadas para la curva estándar a partir de ADN de carne cruda de cerdo y pavo

Dilución	Cantidad de ADN
1	20 ng/ $\mu$ L
2	2 ng/ $\mu$ L
3	200 pg/ $\mu$ L
4	20 pg/ $\mu$ L
5	2 pg/ $\mu$ L

### **5.1.5. Optimización de Cebadores y Sondas**

Se utilizaron dos pares de cebadores y sus respectivas sondas de hidrólisis específicos previamente reportados (Koppel et al., 2008). Estos oligonucleótidos están dirigidos al gen de la beta actina para cerdo y al gen receptor de la prolactina para pavo. Las sondas de hidrólisis y cebadores se adquirieron de la casa comercial IDT (UNIPARTS, USA). Ambas secuencias de cebadores y sondas, así como el fluoróforo que utilizan, extintor y tamaño del amplicon se muestran en la Tabla 5.

La optimización de los cebadores y sondas se realizó comparando los valores de eficiencia de la curva respecto a la concentración de cebadores (nM) empleados, siguiendo una relación 1:1 de cada par (200/200, 400/400, 600/600 y 900/900) hasta llegar a obtener rangos de eficiencia del 90 al 110%. Las concentraciones de sondas de hidrólisis que se utilizaron en cada una de las pruebas fueron de 80 nM, 150 nM y 250 nM para encontrar una eficiencia superior al 90% e inferior al 110%.

Tabla 5. Cebadores y sondas de hidrólisis empleados

Cebadores y sondas	Concentración final (nM)	Secuencia	Amplicón	Fluoróforo/extintor
Cerdo			80 pb	
C_Fwd	900	CGAGAGGCTGCCGTAAAGG		
C_Rev	900	TGCAAGGAACACGGCTAAGTG		
Sond_C	250	TCTGACGTGACTCCCCGACCTGG		Cy3/BHQ2
Pavo			83 pb	
P_Fwd	900	CAA AGA AAG CAG GGA AAA GGA		
P_Rev	900	TGCACTCTCGTTGTTAAAAGGA		
Sond_P	250	CTGGGAAAGTTACTGTGTAGCCTCAGAACG		Cy5/BHQ2

### **5.1.6. Desarrollo de una Curva Estándar Dúplex a Partir de Mezclas de ADN Sometido a Tratamiento Térmico**

Se realizó una curva estándar para cerdo y pavo con ADN extraído de homogeneizados cárnicos sometidos a tratamiento térmico (72 °C/10 min). Se siguió la misma metodología que se describe en el punto 5.1.4. del presente trabajo, salvo modificaciones en las diluciones del ADN. El ADN de cada especie se diluyó a 10 ng/μL y se llevaron a cabo dos diluciones seriadas 1:10 y 1:100 las cuales corresponden a 3 puntos de la curva de cuantificación. Posteriormente a partir del primer punto de la curva (10 ng/μL) se realizaron dos diluciones, una 1:2 y la otra 1: con el fin de presentar dos puntos intermedios en la curva estándar dúplex. Las diluciones y concentraciones de ADN se muestran en la Tabla 6. Bajo las mismas condiciones de termociclador y mezcla de reacción mencionadas anteriormente, los estándares se sometieron al protocolo qPCR establecido.



Tabla 6. Diluciones y concentraciones de ADN empleadas para la curva estándar dúplex a partir de ADN de cerdo y pavo sometidos a tratamiento térmico.

Dilución	Punto de la curva estándar (%)	Cantidad de ADN
Stock	100	10 ng/μL
1:2	50	5 ng/μL
1:4	25	2.5 ng/μL
1:10	10	500 pg/μL
1:100	1	50 pg/ μL

### **5.1.7. Elaboración de Mezclas Cárnicas y Estándares de Jamón**

Se realizaron mezclas de homogeneizados de carne de cerdo y pavo, dichos homogeneizados fueron sometidos a tratamiento térmico previamente. La mezcla se llevó a cabo en 1 mL de homogeneizado. La Tabla 7 muestra el código de las mezclas de carne y el porcentaje de la proporción de cada homogeneizado.

Para la elaboración de jamones estándar, la carne (aproximadamente 15 kg de carne cada especie) de cerdo (pierna) y pavo (pierna) se obtuvo de un mercado local en Hermosillo, Sonora, México. La carne se almacenó a -20 °C hasta su análisis. La carne se preparó para elaborar un proceso de 5 jamones horneados. Cada uno de los jamones se elaboró bajo las especificaciones de la NOM-158-SCFI-2003 con ayuda de un Técnico en Alimentos profesional en la Planta Piloto de Productos Cárnicos ubicada en las instalaciones de CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.) en la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Los ingredientes se ajustaron para elaborar jamones de 3 kg cada uno. Los ingredientes empleados en la elaboración de los jamones se muestran en la Tabla 8. Los ingredientes incluyeron fosfatos, sal de mesa, nitritos y nitratos (Sal Praga) extracto de especias, azúcar, carragenina, eritorbato de sodio, almidón modificado, caseína y proteína de soya. También se añadió agua purificada y hielo. Los ingredientes fueron obtenidos de la casa comercial CARNOTEX (Hermosillo, Sonora, México)..

Basándose en la metodología propuesta por Koppel et al., (2011) y con algunos ajustes, se elaboró un conjunto de muestras estándar para cada una de las especies bajo estudio, cada conjunto tuvo 1, 25, 50, 75 y 99% peso/peso (p/p) de cada una de las especies que posteriormente se sometieron al sistema qPCR elaborado. La Tabla 9 muestra el porcentaje de carne que contenía cada jamón elaborado.

Tabla 7. Mezclas de homogeneizados de carne de cerdo y pavo sometidos a tratamiento térmico

Código de la mezcla	Volumen del homogeneizado de cerdo ( $\mu\text{L}$ )	Volumen del homogeneizado de pavo ( $\mu\text{L}$ )	Porcentaje	
			Cerdo	Pavo
A	1000	0	100	0
B	990	10	99	1
C	900	100	90	10
D	700	300	70	30
E	500	500	50	50
F	300	700	30	70
G	100	900	10	90
H	0	1000	0	100

Tabla 8. Lista de ingredientes (%) utilizados en la elaboración de jamones

Ingredientes	Peso (g)	%
Carne	3000	55.55
Agua	1425.40	26.39
Hielo	610.90	11.31
Sales de fosfato (PO <sub>4</sub> )	24.30	0.45
Sal	70.30	1.30
Sal Praga (Nitritos y Nitratos)	8.10	0.15
Condimento California® (Extracto de especias)	22.70	0.42
Azúcar	48.60	0.90
Carragenina	22.70	0.43
Eritorbato de Sodio	10.80	0.20
Gelamil 100® (Almidón modificado)	81.10	1.50
Proteína 595	54.10	1.00
Caseína	21	0.38
Total	5400	100

Tabla 9. Composición cárnica de los jamones elaborados en planta piloto

Producto	%Cerdo	%Pavo	Peso cerdo (g)	Peso pavo (g)
Jamón 1	99	1	2970	30
Jamón 2	75	25	2250	750
Jamón 3	50	50	1500	1500
Jamón 4	25	75	750	2250
Jamón 5	1	99	30	2970

La carne de cada uno de los jamones fue limpiada manualmente con el fin de eliminar la mayor cantidad de grasa y tejido cartilaginoso. Posteriormente ésta fue molida (molino Hobart modelo 4152, USA) utilizando un disco SPECO INC #400 4HK. La salmuera se preparó adicionando cada uno de los ingredientes que aparecen en la Tabla 8, a excepción de la carne, en un recipiente profundo con capacidad de aproximadamente de 10 Ly homogeneizados con una licuadora de mano Oster® (USA).

La carne previamente molida fue adicionada a la masajeadora Suhner AG (CH-5620 MSP 200,(Compañía, Bremgarten Switzerland) junto con la salmuera. Una vez obtenida las muestras de la masajeadora, se colocaron en una embutidora manual Smith RISCO RS 2050 (Smith®, NY USA). El embutido se colocó en tripas de celulosa con capacidad de 1.5 kg, por lo que cada jamón fue embutido en 2 tripas. Posteriormente, los jamones se sometieron a tratamiento térmico en un horno de cocedor/ahumador CVU-350 (Enviropack, Oregon, EUA). Los jamones permanecieron 45 minutos en el horno ac una temperatura de 60 °C en bulbo seco y 120 °C bulbo húmedo, posteriormente 45 minutos con un ajuste de temperatura de 71.1 °C bulbo seco y 65.5 °C bulbo húmedo. Una vez alcanzada la temperatura interna de 72 °C; los jamones permanecieron 10 minutos más en cocción a dicha temperatura. Finalmente los jamones fueron retirados del horno y se sometieron a un enfriamiento mediante sumergido en agua fría (1 a 4 °C). Las muestras fueron almacenadas a 0° C por 24 h para su posterior análisis.

Se tomó una muestra de la parte central de cada jamón de 200 g. De esta muestra, se tomó una porción de 50 g d fue homogeneizada con 150 mL volumen de buffer PBS dentro de una licuadora Oster® por un minuto. La figura 3 muestra un diagrama del muestreo elaborado para cada jamón.

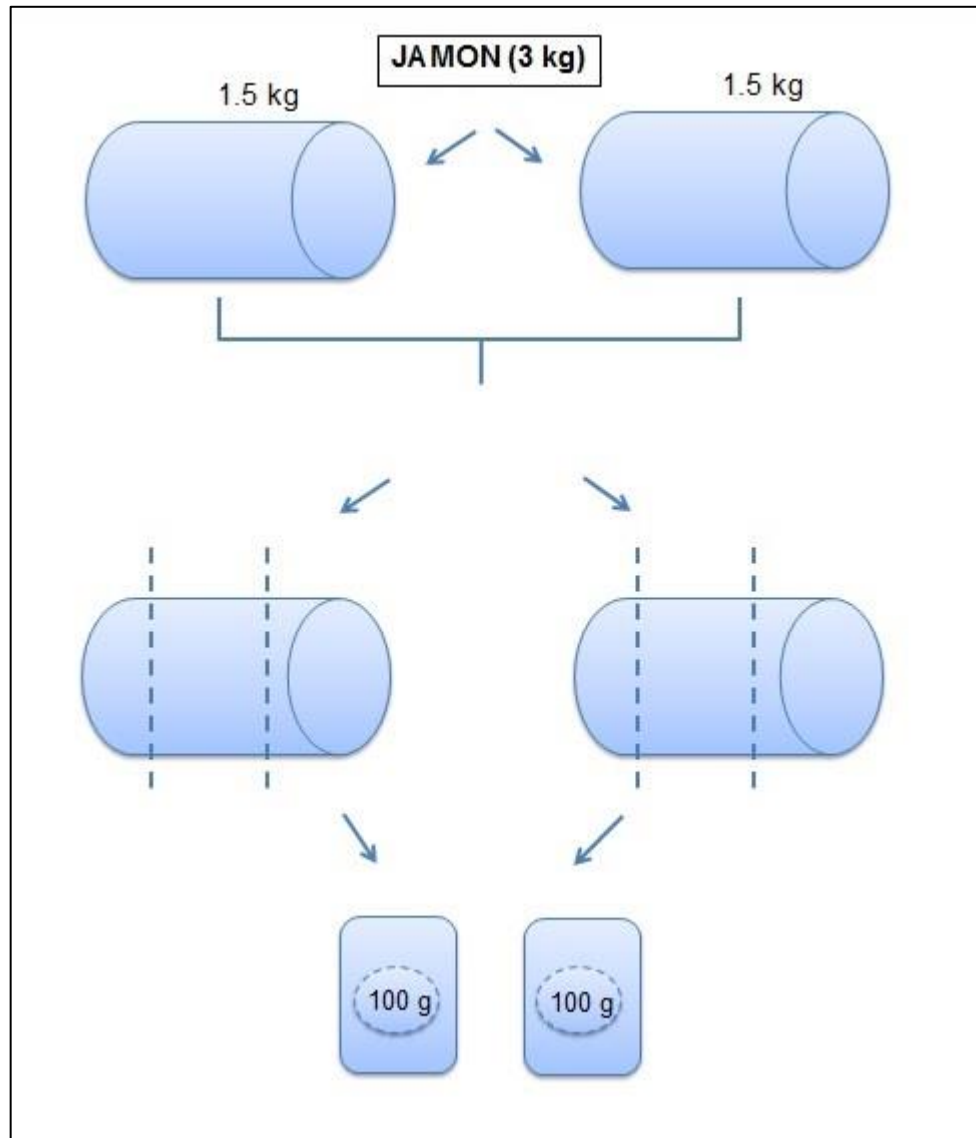


Figura 3. Toma de muestra de jamón elaborado en planta piloto

### **5.1.8. Detección y Cuantificación de ADN en mezclas cárnicas de composición conocida y estándares de jamones**

Siguiendo los lineamientos que se muestran en el punto 5.1.1. se realizó la extracción, purificación y cuantificación de ADN a cada una de las mezclas cárnicas de proporciones conocidas, a los jamones elaborados en Planta Piloto y 9 jamones comerciales, las características de éstos se muestran en la Tabla 10. Una vez cuantificado el ADN por método de fluorescencia, éste se ajustó a la concentración de 5 ng/ $\mu$ L y se sometió al sistema qPCR, con la curva estándar dúplex previamente elaborada, el control de amplificación interno y controles negativos. El protocolo qPCR fue de 95 °C por 20 s, y 40 ciclos de 95 °C por 3 s, 60 °C por 30 s. La mezcla de reacción se separó en 2 partes: la mezcla 1 se dirigió a la curva estándar y un triplicado de cada muestra y, la mezcla 2 se dirigió a un duplicado para cada muestra que contiene el IAC. Los volúmenes y concentración de cada reactivo para cada reacción se muestran en la Tabla 11.



Tabla 10. Código de jamones comerciales y especies animales declaradas en la etiqueta del producto.

Código del jamón comercial	Especies declaradas en la etiqueta
H1	Cerdo
H2	Cerdo
H3	Cerdo
H4	Pavo
H5	Pavo y Cerdo
H6	Pavo y Cerdo
H7	Pavo y Cerdo
H8	Cerdo
H9	Pavo y Cerdo

Tabla 11. Mezclas de reacciones qPCR

Reactivo	Volumen Mezcla de Reacción 1 ( $\mu\text{L}$ )	Volumen Mezcla de Reacción 2 ( $\mu\text{L}$ )
Cebador delantero cerdo	0.72	0.72
Cebador reverso cerdo	0.72	0.72
Sonda hidrólisis cerdo	0.50	0.50
Cebador delantero pavo	0.72	0.36
Cebador reverso pavo	0.72	0.36
Sonda hidrólisis pavo	0.50	0.50
ADN	5	5
Agua libre de nucleasas	1.12	0.34
2X Universal Mastermix Fast®	10	10
IAC	0	1
Sonda hidrólisis IAC	0	0.50

## 5.2. Validación del Sistema qPCR

Se estimó el Límite de Detección (LOD) al observar la cantidad mínima detectable del analito en las diluciones seriadas del mismo para la elaboración de la curva estándar y, el Límite de Cuantificación (LOQ) se determinó al observar la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificado por el equipo y que su valor sea reproducible en el 95% de los ensayos. El LOD y el LOQ establecido por resultados de condiciones interlaboratorio (Soares *et al.*, 2013; 2014; Koppel *et al.*, 2013). Los ensayos interlaboratorio son la validación del sistema analítico al momento de reproducir el ensayo en distintos laboratorios. Los laboratorios para dicho ensayo fueron el laboratorio de *Ricerca e Sviluppo* del *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale"*, Teramo, Italia y Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos y Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos en CIAD, Hermosillo, Sonora, México).

Mezclas cárnicas con proporción conocida (Tabla 7) se sometieron al sistema qPCR propuesto y se comparó el valor estimado con el verdadero (Soares *et al.*, 2013; 2014). Los valores obtenidos reportaron un coeficiente de variación menor del 25% en cada corrida (Koppel *et al.*, 2008; 2011). Cada muestra se sometió al sistema por triplicado, recuperando la media y la desviaciones estándar de los resultados.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Extracción de ADN Para Homogeneizados Sometidos a Tratamiento Térmico

Al momento de obtener una extracción de ADN de los homogeneizados sometidos al tratamiento térmico, la concentración de ADN (ng/ $\mu$ L) fue inferior a los 20 ng/ $\mu$ L, contraste al trabajo de Koppel *et al.*, (2011). Este problema no se presentó en la extracción de homogeneizados de carne cruda, los cuales si superaban la concentración de 20 ng/ $\mu$ L. La Tabla 12 muestra un ejemplo de la cantidad de ADN extraído en el caso de las muestras sometidas al tratamiento térmico. La baja concentración se debe principalmente a que el ADN se degrada por el tratamiento térmico en matrices complejas, lo que hace en muchos casos imposible la detección de secuencias blanqueadas. Fragmentos de ADN más cortos (100-200 pb) pueden ser analizados para evitar esta alta degradación (Dooley *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2011). La cantidad de ADN de cada una de las muestras difiere entre ambos métodos de cuantificación y también se muestra en la Tabla 12, donde por duplicado se realizaron las cuantificaciones.

Tabla 12. Concentración de ADN de homogeneizados de cerdo y pavo medida por espectrofotometría y fluorescencia

Método de Extracción	Cuantificación de ADN por espectrofotometría		Cuantificación de ADN por fluorescencia	
	Cerdo	Pavo	Cerdo	Pavo
	[ng/ $\mu$ L]	[ng/ $\mu$ L]	[ng/ $\mu$ L]	[ng/ $\mu$ L]
Wizard Genomic DNA Purification Kit (200 mg)	18.5 $\pm$ 0.5	15.3 $\pm$ 0.3	9.3 $\pm$ 0.02	6.06 $\pm$ 0.1

Para términos de ensayos qPCR y cuantificación de ADN, el material genético extraído debe cuantificado en su totalidad, por lo que se deben emplear métodos espectrofotométricos (NanoDrop) para su cuantificación y si es necesario métodos de fluorescencia (PicoGreen®). Es importante en este caso cuantificar el ADN con técnicas de fluorescencia después de una basada en espectrofotometría para asegurar la cantidad de ADN con la que se cuenta, debido a que las técnicas espectrofotométricas también cuantifican ácidos nucleicos libres y ARN (Ácido Ribonucleico) por lo que pudiera haber un valor sobreestimado de la concentración de ADN obtenido. Debido a la naturaleza compleja de la muestra (matrices cárnicas sometidas a tratamiento térmico) y las alteraciones que ejerce ésta sobre el ADN, existe mayor probabilidad de que haya gran cantidad de ácidos nucleicos libres en la solución de ADN purificado. Las razones anteriores justifican que las concentraciones de ADN obtenidas en la extracción y purificación del mismo no alcanzaron la concentración sugerida por Koppel *et al.* (2008; 2011).

Al enfrentar un problema de poca concentración de ADN en cada extracción, se cambió el rango dinámico de trabajo que se pretendía seguir. Así, de 20 ng/μL pasó a ser de 5 ng/μL. También, sustancias presentes en las muestras de alimentos pueden ser extraídas a su vez con el ADN y afectar una futura PCR, estas sustancias pueden ser polisacáridos, proteínas, compuestos fenólicos y algunos metabolitos secundarios (Cankar *et al.*, 2006). Por estas razones se optó por utilizar el kit de purificación Expin SV®, el cual purifica y concentra el ADN extraído, reduciendo las posibilidades de que la amplificación sea bloqueada, la reacción sea inhibida o que los valores de Ct obtenidos en la qPCR sean más altos de lo esperado y a su vez, la eficiencia de la reacción no disminuya.

Existen kits comerciales de extracción y purificación de ADN que son especializados para alimentos. Se utilizó también el kit Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food en el cual se observaron las mismas limitantes en cuanto a la cantidad de ADN extraído. Por la razón anterior y al ser más

económico, se optó por utilizar el Wizard® Genomic DNA Purification kit como método de extracción previo al kit Expin® y al el sistema qPCR presentado.

El protocolo de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit establece que 200 mg de tejido deben de ser agregados a la solución de lisis nucleica. Debido a que puede ser tedioso y consumista de tiempo pesar dicha cantidad establecida en un análisis de rutina, se añadieron 800 µL del homogeneizado en su lugar. El homogeneizado se inició con 50 g de carne y 150 mL de PBS, por lo que en teoría deberá haber 200 mg de tejido en 800 µL de homogeneizado. Las extracciones de ADN se realizaron por triplicado y el volumen recuperado en cada una (100 µL) se sometió al kit Expin® para alcanzar valores por encima de 20 ng/ µL de ADN y un volumen de aproximadamente 30 µL.

## 6.2. Implementación de un Control de Amplificación Interno

El IAC elaborado es un oligonucleótido de cadena sencilla, y éste funciona como control para saber si hay alguna inhibición en la reacción de qPCR. La inhibición se puede dar por componentes que no hayan sido eliminados en la purificación del ADN o mismos componentes del método de extracción (Dooley *et al.*, 2004). El IAC al ser un control interno, siempre debe amplificar y en esta ocasión estaba intencionado a ser utilizado en el sistema dúplex, por lo que el sistema sería en realidad un sistema tríplex. El IAC presenta la característica de que su secuencia está diseñada para que los cebadores específicos para cerdo del sistema qPCR también lo amplifiquen, utilizando sólo una sonda de hidrólisis diferente y aprovechando así reactivos que ya se poseen sin necesidad de sintetizar otros y/o el uso de un control comercial (plásmidos).

El IAC al ser un oligonucleótido se maneja como ADN y se agrega a la mezcla de reacción, así en lugar de ser 5 µL de ADN en la mezcla, estos

pasaron a ser 6 (1  $\mu\text{L}$  de IAC). El IAC se diluyó a una concentración de 0.00001 fg/  $\mu\text{L}$  como fue propuesto en el ensayo de Cammà *et al.*, (2012), con el fin de que una pequeña cantidad de cebadores y sondas sean dirigidos hacia él. Sólo dos trabajos han reportado el uso de controles de amplificación internos sintetizados por los autores (Cammà *et al.*, 2012; Laube *et al.*, 2007).

Al momento de hacer ensayos con el IAC sintetizado en ésta prueba dúplex, se observó como resultado solamente ruido de fluorescencia en el equipo, lo cual indica una reactividad cruzada entre algún componente de la mezcla de reacción o ADN de interés. En este caso, el ruido del equipo se presentaba al incluir ADN de cerdo con el IAC. Lo anterior nos indica un problema de interferencia entre la sonda del IAC con la sonda del cerdo o bien, interferencia entre la sonda del cerdo con el IAC, se descarta la posibilidad de inhibición por la mezcla de reacción, ya que hubo amplificación del IAC con ADN de pavo sin incluir la sonda de hidrólisis del cerdo. Por esta última razón, se optó por dejar la reacción dúplex y colocar el IAC en un pocillo distinto a las muestras, con el ADN de interés y así demostrar si existen o no inhibiciones en la reacción al observar su amplificación.

La prueba de amplificación con diluciones seriadas del IAC a partir de 10 fg/ $\mu\text{L}$  hasta 0.00001 fg/ $\mu\text{L}$  se muestran en la Figura 4 Cada muestra sometida al sistema qPCR se corrió con el IAC en un pocillo distinto y sin sonda de hidrólisis de cerdo; todas las muestras amplificaron el IAC, indicando que no hubo inhibiciones.



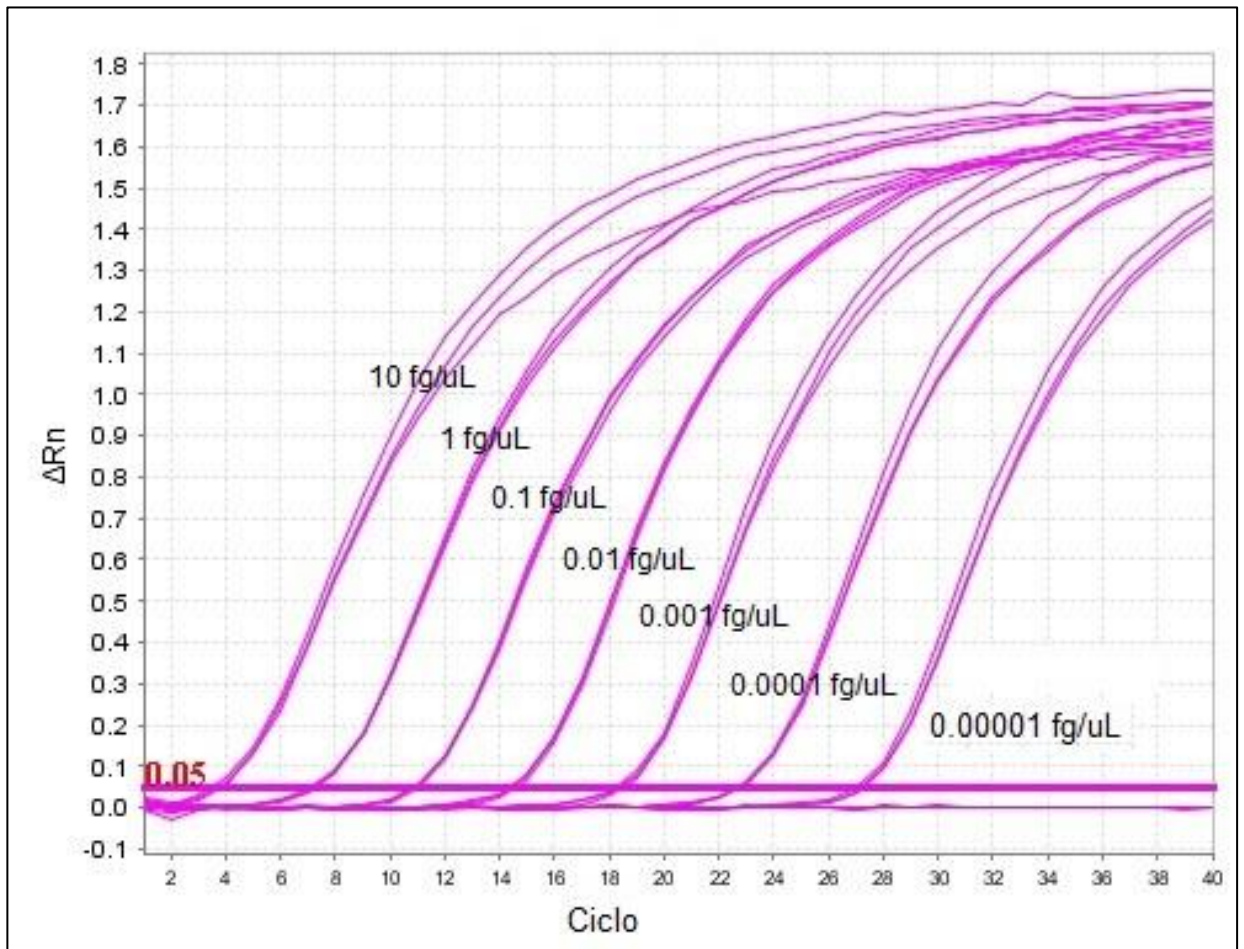


Figura 4. Diluciones seriadas del control de amplificación interno

### 6.3. Eficiencia en las Curvas Estándar

La eficiencia de la qPCR fue calculada de acuerdo a la fórmula 1. Applied Biosystems® y lineamientos internacionales (Bustin *et al.*, 2009; Dorak *et al.*, 2006) sugieren que en los ensayos qPCR de cuantificación absoluta, la eficiencia de la curva estándar sea superior al 90% y llegue a un 110% como máximo. Cuando la eficiencia se encuentra en estos rangos se puede inferir que el amplicon se duplica en cada ciclo. Esto corresponde a una pendiente de 3.1 a 3.6 en el valor de Ct vs logarítmica del ADN cuantificado en la curva estándar. Con el fin de obtener resultados precisos y exactos las reacciones deben obtener una eficiencia lo más cercano al 100% posible y, en cualquier caso, la eficiencia debe ser similar para las especies a identificar. Diversas variables pueden afectar la eficiencia de la qPCR. Estos factores incluyen un amplicon con una gran longitud, presencia de inhibidores y el diseño de los cebadores. Aunque se puede obtener resultados validos que se salgan de los rangos de 90-110%, la qPCR deberá ser optimizada o diseñar amplicones alternativos (Dorak *et al.*, 2006).

Una eficiencia inferior al 90% generalmente se debe a una reacción con malas condiciones (mal diseño de cebadores, reacciones químicas indeseadas, mal manejo del analista) y superior al 110% generalmente se debe a inhibidores que fueron acarreados desde la extracción del ADN (etanol u otros solventes, ARN). Una eficiencia superior también se puede deber a que hay un exceso de la cantidad del ADN, por lo que se recomienda siempre realizar diluciones seriadas para la elaboración de una curva estándar, con el fin de realizar los menores pasos de pipeteo posibles (Bustin *et al.*, 2009; Koppel *et al.*, 2008).

La Tabla 13 y las Figuras 7, 8, 9 y 10 muestran las eficiencias y la curva de amplificación con sus respectivos Ct, que se obtuvieron en las curvas de calibración a partir de carne cruda de cerdo y de pavo. La eficiencia obtenida se encuentra en los rangos de porcentaje deseados. Los resultados dependieron

directamente de la optimización de cebadores y sondas, por lo que esta prueba sólo se realizó para establecer la eficiencia del ensayo qPCR y establecer concentración de cebadores y sondas. La eficiencia de la amplificación de la qPCR debe establecerse por medias de curvas estándar, por lo que cada punto de la misma se realizó por triplicado. La curva es sumamente importante ya provee una indicación simple, rápida y reproducible de la eficiencia de la PCR, la sensibilidad analítica y la robustez del ensayo qPCR (Bustin *et al.*, 2009).

Cada curva de amplificación (Fig. 8 y 10) muestra los valores de los Ct conforme un orden de aparición, las Tablas 14 y 15 interpretan los valores relacionándolos con la cantidad de ADN presente en el pocillo.

Tabla 13. Pendiente, eficiencia y  $R^2$  de los ensayos qPCR a partir de carne cruda

Especie	Pendiente	Eficiencia (E)	$R^2$
Cerdo	-3.356	98.58	0.998
Pavo	-3.346	98.99	0.998

La Eficiencia (E) se calculó con la fórmula  $E = (10 / \text{pendiente} - 1) \times 100$ , la pendiente y el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) se calcularon por medio de la curva estándar

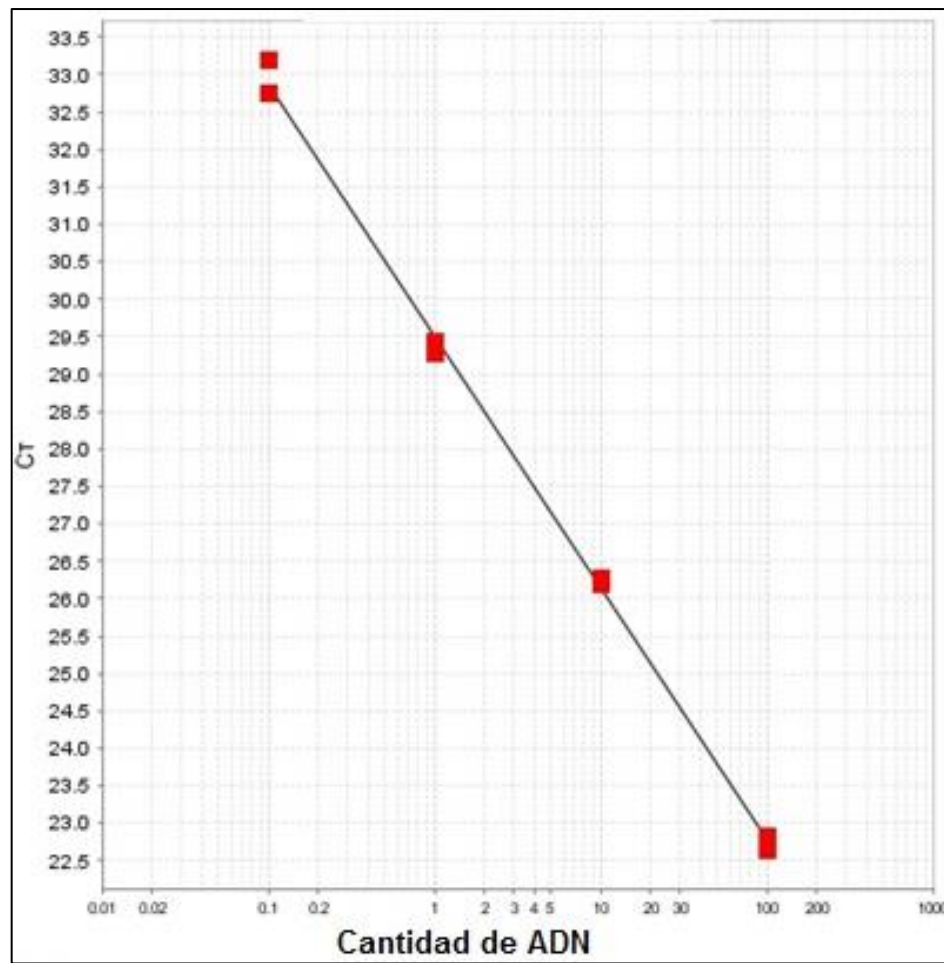


Figura 7. Curva estándar de cerdo a partir de carne cruda

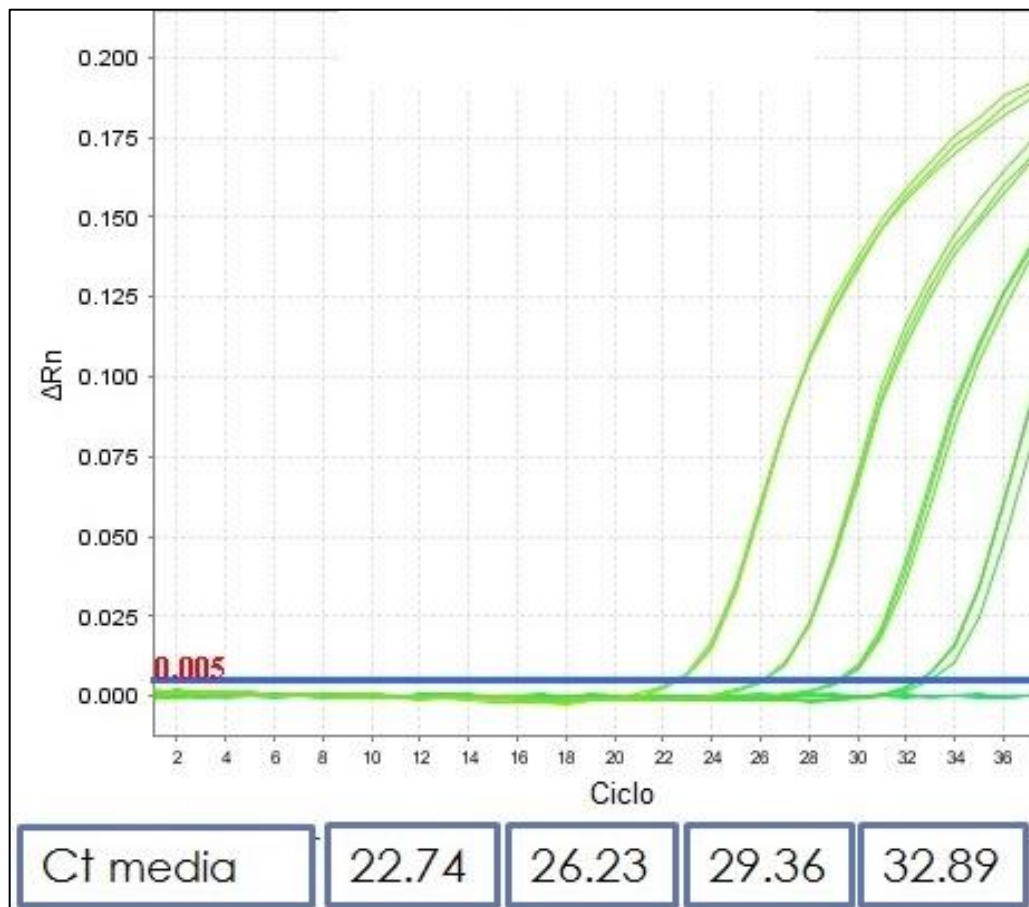


Figura 8. Curva de amplificación para cerdo a partir de carne cruda

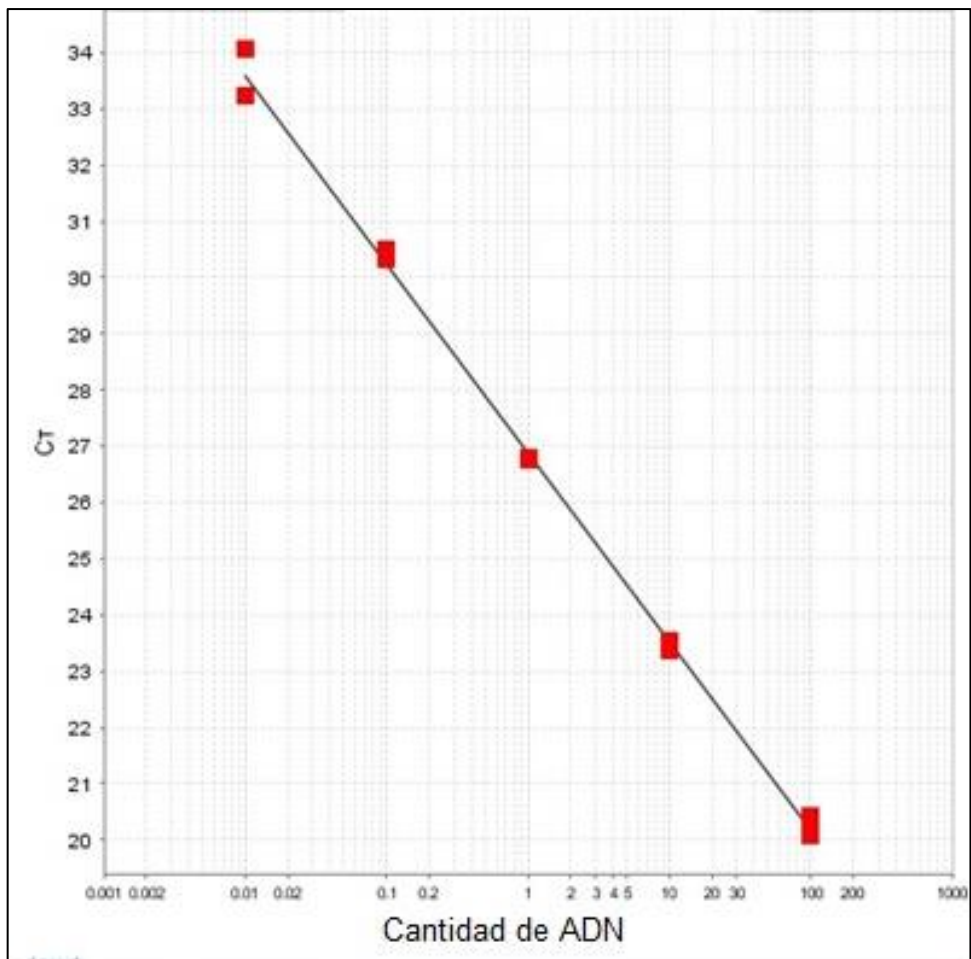


Figura 9. Curva estándar para pavo a partir de carne cruda

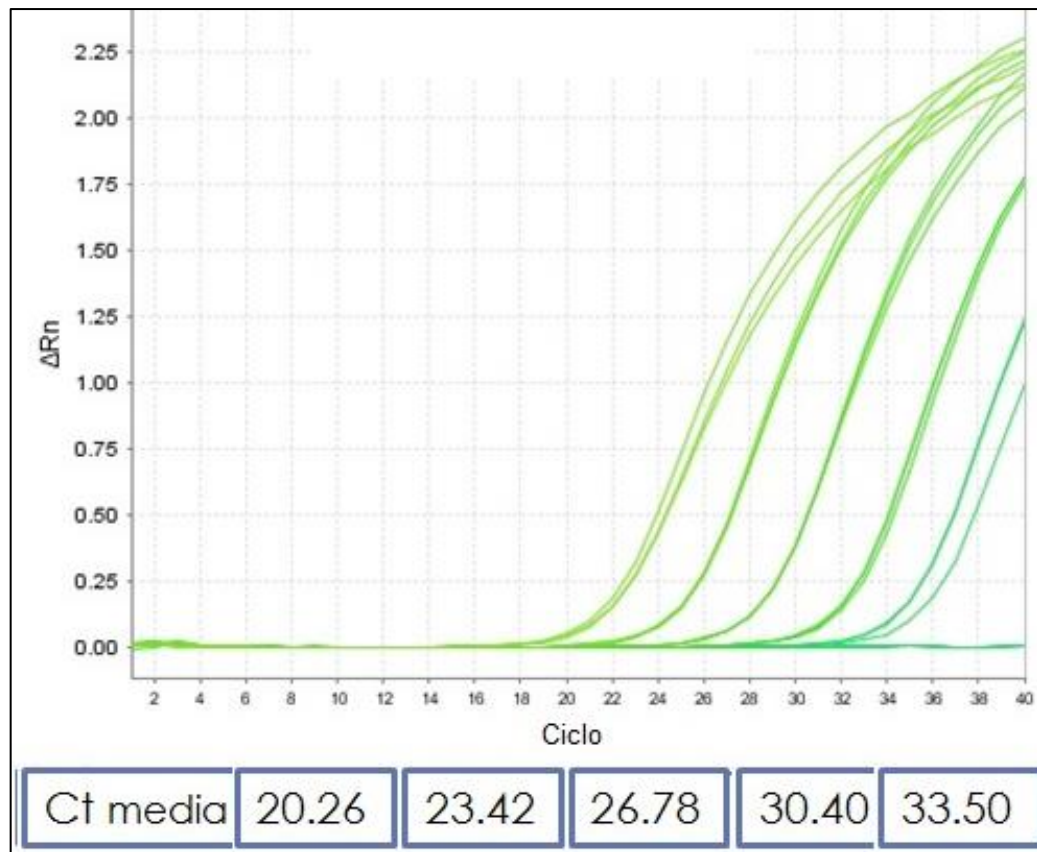


Figura 10. Curva de amplificación para pavo a partir de carne cruda



Tabla 14. Relación de los valores Ct con el contenido de ADN en curva de calibración de carne de cerdo cruda

Ct media	% de ADN	ADN total
22.74	100	100 ng
26.23	10	10 ng
29.36	1	1 ng
32.89	0.1	100 pg

Tabla 15. Relación de los valores Ct con el contenido de ADN en curva de calibración de carne de pavo cruda

Ct media	% de ADN	ADN total
20.26	100	100 ng
23.42	10	10 ng
26.78	1	1 ng
30.40	0.1	100 pg
33.50	0.01	10 pg

En el caso de la curva estándar del cerdo, de ADN a partir de carne cruda, sólo se alcanzó a cuantificar 100 pg. Una manera de ajustar la eficiencia en una curva, es eliminando el primer o último punto de la misma, ya que estos generalmente sesgan los valores de la curva al ser los puntos con el ADN en mayor o menor concentración. En este caso se eliminó el punto que correspondería a 10 pg, ya que hubo una mala amplificación y la eficiencia superaba el 110%. No obstante, se verificó la linealidad del modelo con una  $R^2$  de 0.998 y se justifica que éstas curvas se realizaron con los propósitos de establecer la cantidad óptima de cebadores y sondas de hidrólisis.

La optimización de los cebadores y sondas de hidrólisis descrita en el punto 5.1.5. cambió de una concentración de 200 nM de cebadores y 80 nM de sonda de hidrólisis propuestas por Koppel *et al.*, (2008) a una de 900 nM para cebadores y 250 nM para sonda de hidrólisis. Esto se debió a que con la concentración propuesta inicialmente, la eficiencia de la curva no alcanzaba el 90%. Koppel *et al.*, (2008; 2011) utilizaron curvas de calibración sencillas para cada uno de sus targets, el sistema múltiplex se llevó a cabo en el momento de hacer la mezcla de reacción con cebadores y sondas de hidrólisis dirigidas a 4 distintos blancos, siendo éste el sistema múltiplex. Al haber menor cantidad de ADN del blanco, la concentración de las sondas de hidrólisis y cebadores debe ser menor al haber menor, o de lo contrario la eficiencia de la reacción sobrepasaría el 110% al haber múltiples sondas de hidrólisis y cebadores en exceso.

#### 6.4. Curva Estándar Dúplex Para Mezclas Cárnicas Sometidas a Tratamiento Térmico

Previamente, no se han encontrado trabajos reportados en los que utilicen una curva estándar dúplex y los trabajos múltiplex realizan curvas estándar de manera separada para cada especie a analizar (Iwobi *et al.*, 2015; Koppel *et al.*, 2008; 2011; Laube *et al.*, 2007). Otros trabajos múltiplex y en los que han sido realizados a su vez para identificar y cuantificar especies animales, han blanqueado ADN mitocondrial (López-Andreo *et al.*, 2012; Fajardo *et al.*, 2007; 2008; Tanabe *et al.*, 2007; Sawyer *et al.*, 2003) y utilizado el método de cuantificación relativa (Soares *et al.*, 2013).

Es importante realizar una cuantificación absoluta en caso de querer relacionar la cantidad de ADN presente con la proporción del tejido mismo en el producto cárnico. No se conoce con exactitud la cantidad de mitocondrias que contiene una célula, pero si se sabe el alto número de copias del gen mitocondrial excede al genoma nuclear, esta ventaja es alrededor de 10,000 por cada célula (Alberts, 2008). El blanquear ADN mitocondrial presenta ventajas al momento de analizar productos sometidos al tratamiento térmico y se requiere una relativa pequeña cantidad de tejido para extraer el material genético y alcanzar un límite de detección bajo. Sin embargo, al momento de cuantificar, grandes variaciones resultarán en cada corrida distinta y el estándar no siempre será el mismo debido a los altos números de mitocondrias que hay en la célula. Esto resulta sumamente difícil estandarizar un sistema qPCR por cuantificación absoluta.

Debido a que teóricamente existe sólo un paquete de ADN genómico por célula, el utilizar ADN genómico para establecer estándares de concentraciones conocidas en una curva qPCR de cuantificación absoluta no presentará las variaciones que nos pudiera presentar el ADN mitocondrial. Por lo anterior, se decidió utilizar ADN nuclear para cada especie animal. El ADN sufrirá una

desventaja frente al ADN mitocondrial al poder ser degradado más fácilmente por el tratamiento térmico del producto debido a su baja cantidad de copias, pero el tratamiento térmico de los jamones no es severo (superior a 120 °C) por lo que no deberá presentar un problema y podrá ser utilizado en una curva estándar dúplex sin que varíe su concentración, eficiencia y reproducibilidad.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento térmico de los homogeneizados provocó una degradación y una baja extracción de ADN sin poder llegar a la concentración de 20 ng/μL que se utilizó como primer punto en las curvas de homogeneizados a partir de carne cruda. Por la razón anterior se optó por cambiar el rango dinámico de trabajo a 5 ng/ μL. ADN extraído de cada homogeneizado cárnico sometido al tratamiento térmico se llevó a una concentración de 10 ng/μL y se mezclaron y homogeneizaron en un mismo tubo para ser utilizados como primer punto de la curva estándar. Al momento de pipetear los 5 μL de ADN que corresponden para cada reacción, en teoría, 5 ng/μL de cada especie deberán ir en el volumen de trabajo y disminuir el error del analista al realizar una curva por separado.

Una qPCR múltiple requiere presentar resultados evidentes de cuantificación exacta de blancos múltiples, un total de 6 ensayos distintos de la curva Dúplex se realizaron en los cuales valores Ct no variaron y la eficiencia de la curva se encontró en los rangos deseados. Las eficiencias, pendientes, linealidad ( $R^2 > 0.993$ ) y curva estándar para cada especie se muestran en las Figuras 11 y 12, la amplificación dúplex en la Figura 13 y los valores Ct en la Tabla 16.

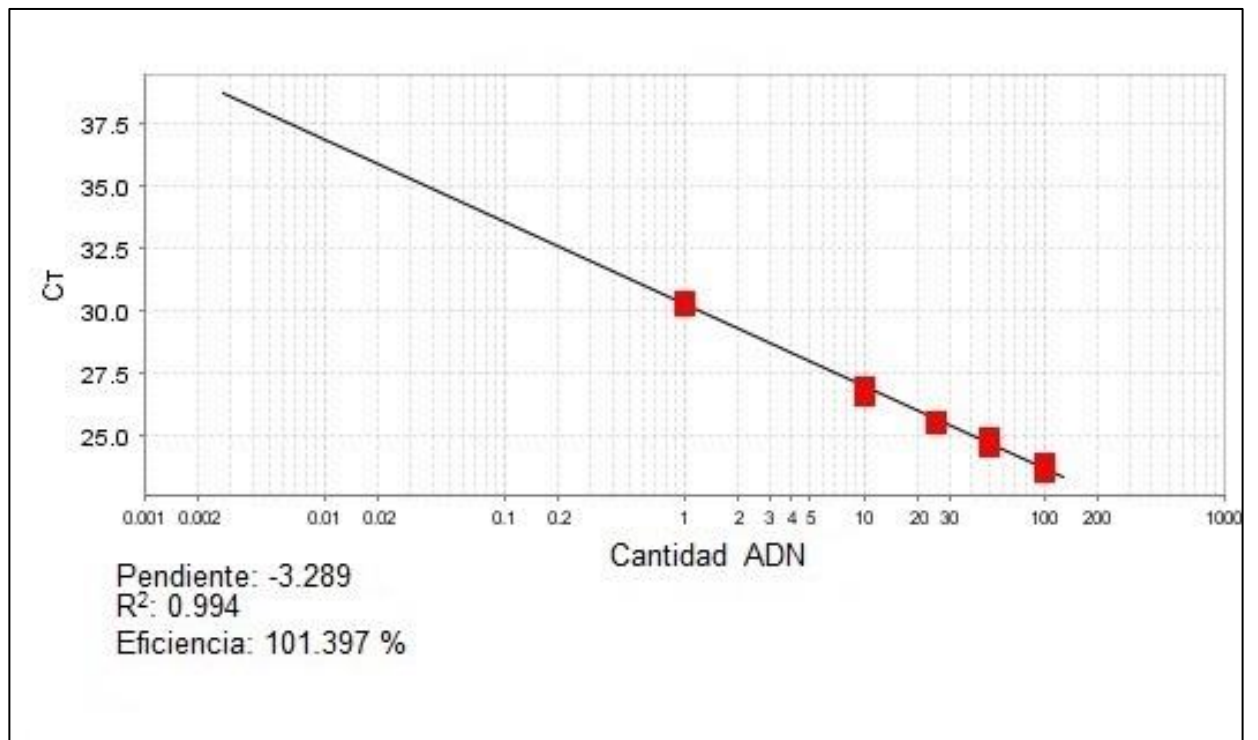


Figura 11. Curva estándar dúplex para cerdo

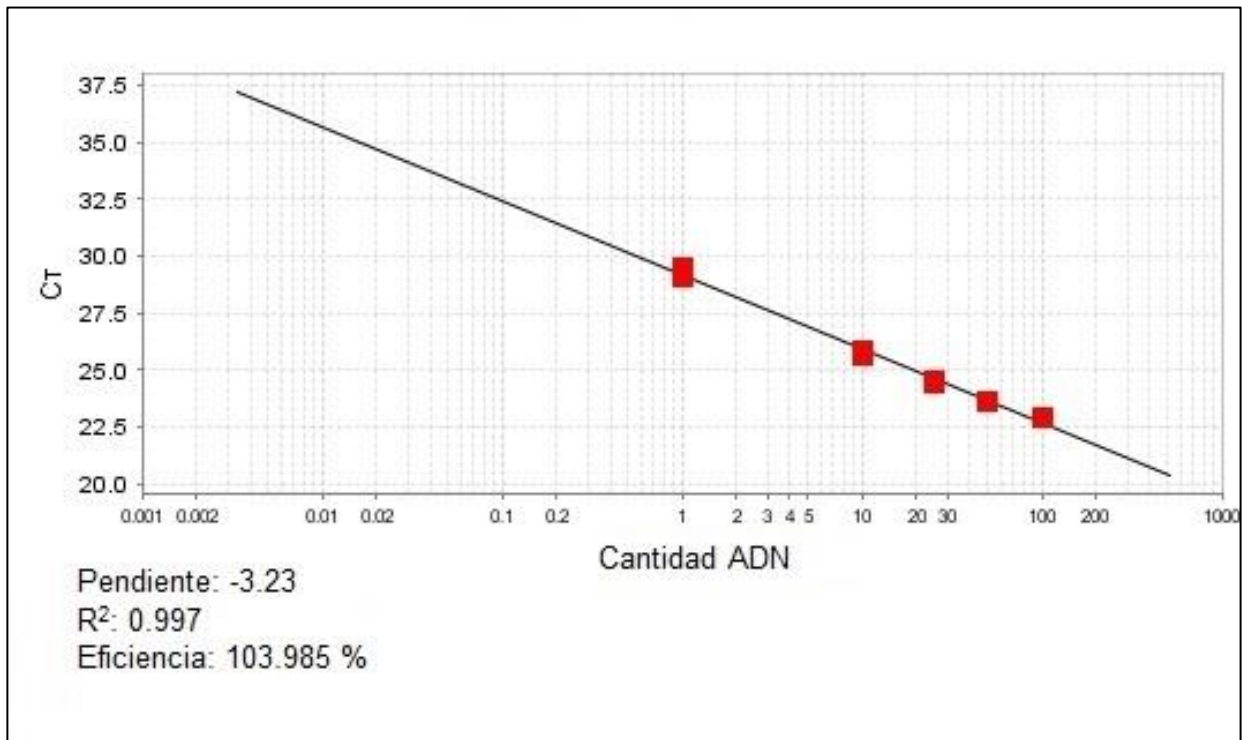


Figura 12. curva estándar dúplex para pavo

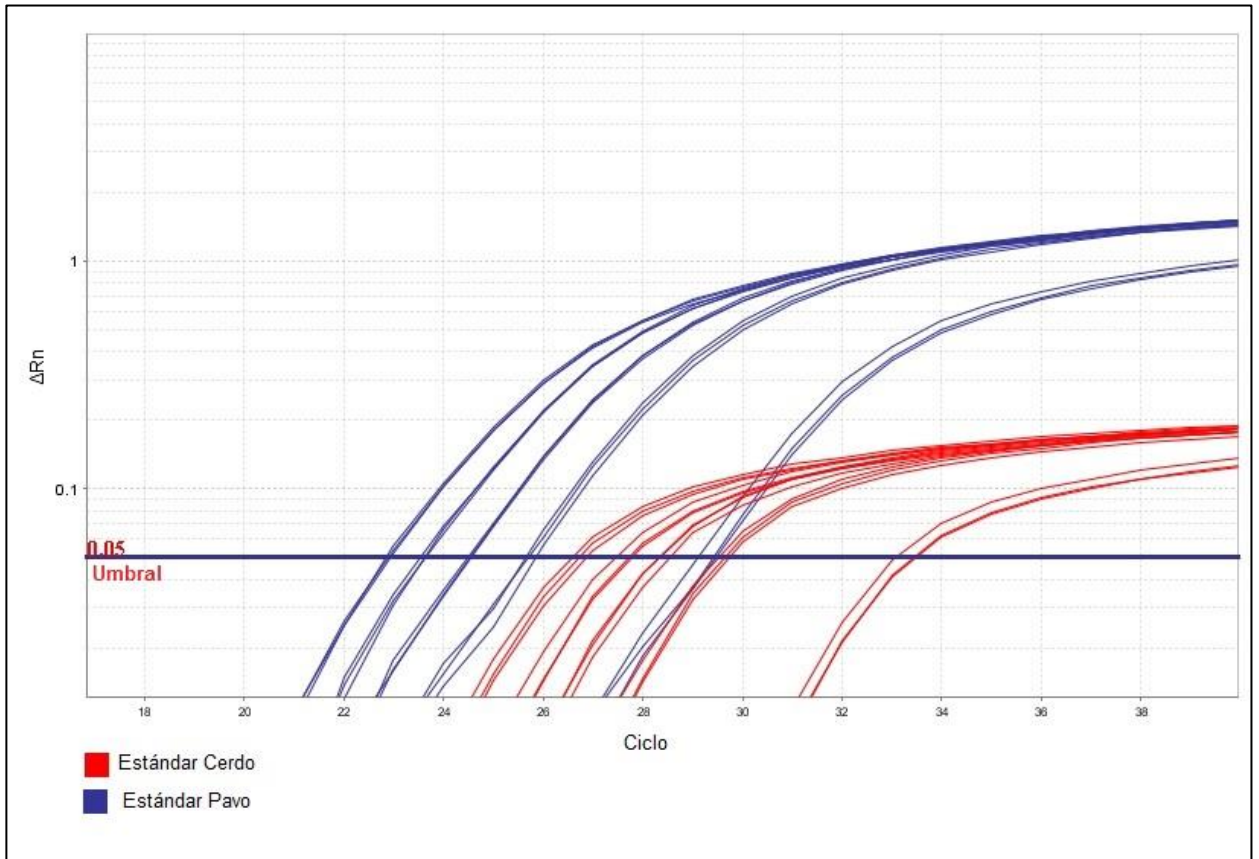


Figura 13. Curva de amplificación del estándar dúplex



Tabla 16. Valores Ct de la curva estándar dúplex con ADN de cerdo y pavo sometido a tratamiento térmico

Punto de la curva	Concentración de ADN por especie	Valor Ct para cerdo	Valor Ct para pavo
1	5 ng/μL	23.77±0.17	22.91±0.03
2	2.5 ng/μL	24.79±0.22	23.63±0.03
3	1.25 ng/μL	25.53±0.08	24.52±0.03
4	1 ng/μL	26.842±0.1	25.72±0.11
5	0.1 ng/μL	30.37±0.11	29.29±0.19

Cada punto de la curva se corrió por triplicado y se muestran las desviaciones estándar de los Ct.

## 6.5. Prueba de Reactividad Cruzada

Las Figuras 8 y 9 muestran la curva de amplificación de cerdo y pavo respectivamente. En la prueba de reactividad cruzada se sometieron los cebadores y sondas específicos de las dos especies de interés con diferentes blancos de ADN de otras especies que pudieran interferir en el sistema qPCR. Principalmente la prueba se realiza para ver la especificidad de los cebadores y sondas de hidrólisis. Donde una amplificación de cualquier otra especie que no sea cerdo o pavo (especies de interés) nos indica que hay poca especificidad y se requiere cambiar de cebador y/o sonda de hidrólisis.

En las Figuras 8 y 9 se muestran en un solo gráfico los resultados de la prueba de reactividad cruzada para el cerdo y pavo respectivamente. En los gráficos se puede observar que las especies que no eran de interés amplificaron, sin embargo fueron a ciclos superiores del 31, lo anterior hace que no afecte al sistema qPCR para muestras cárnicas sometidas a tratamiento térmico que se desarrolló, ya que la mínima concentración cuantificable es el 1% de ADN respecto a 25 ng por ensayo y éste tiene un ciclo aproximado de 30. Además no se recomienda para sistemas qPCR que amplificaciones mayores del ciclo 32 sean incluidas en cuantificación y 36 para identificación ya que en estos ciclos los productos PCR favorecen las reacciones inespecíficas (Bustin *et al.*, 2009; Dorak *et al.*, 2006).

Por otra parte, en la curva de amplificación del cerdo se observa que el jabalí amplifica en un ciclo de interés, lo cual es lógico por ser especies que comparten el mismo género y no es posible diferenciarlas por métodos qPCR. Se utilizan técnicas RT-PCR la cual utiliza enzimas de restricción para la diferenciación de cerdo y jabalí y otras técnicas más sofisticadas como el caso de la secuenciación. Sin embargo no es de interés esta amplificación en este sistema qPCR ya que no se sospecha de la incorporación de carne de jabalí en los productos alimenticios de cerdo, en este caso jamones. Además, el jabalí es

una especie de caza menor y su carne posee un valor comercial más alto que la del cerdo doméstico, por lo que no es factible sustituirla para adulterar un alimento (Fajardo *et al.*, 2006).

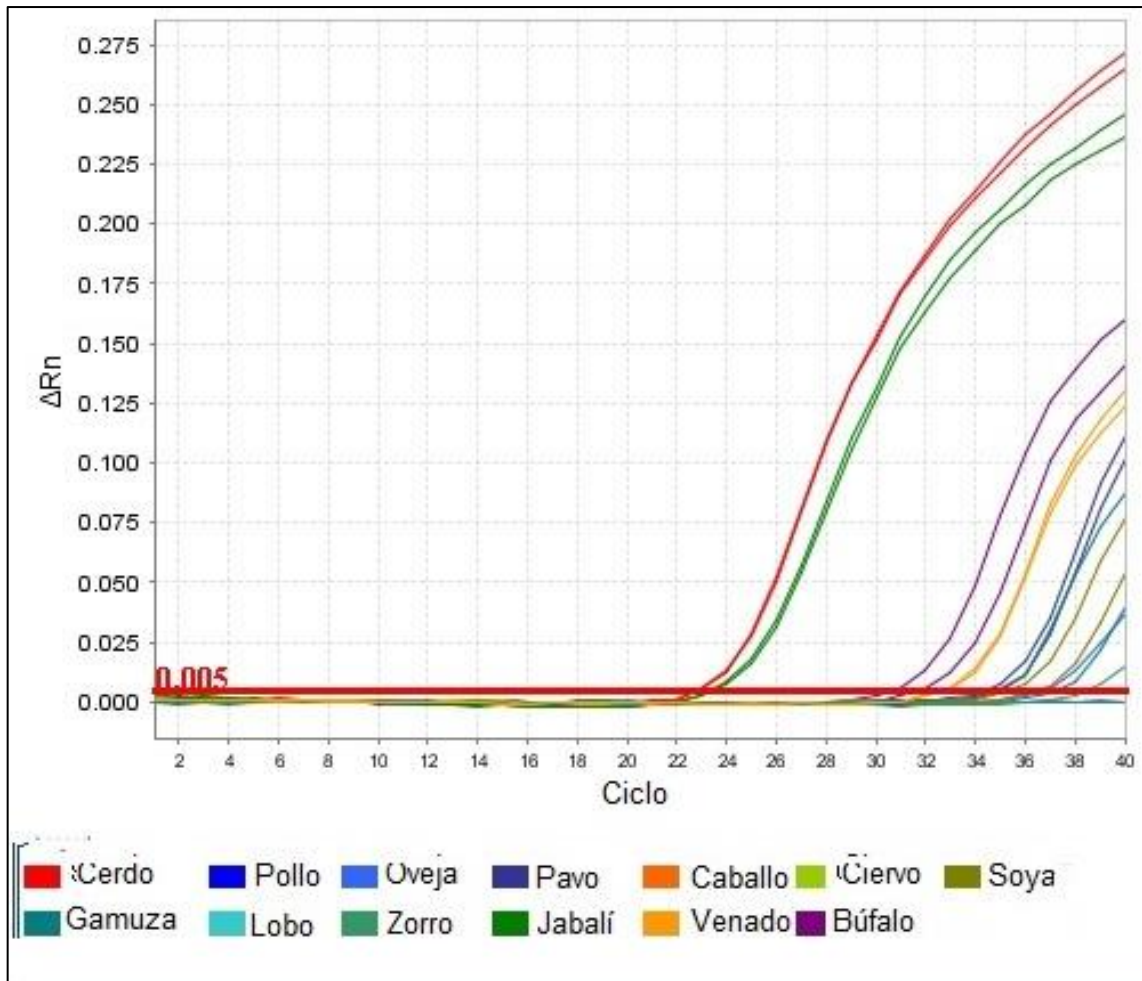


Figura 5. Prueba de especificidad de cebadores y sondas de hidrólisis para cerdo

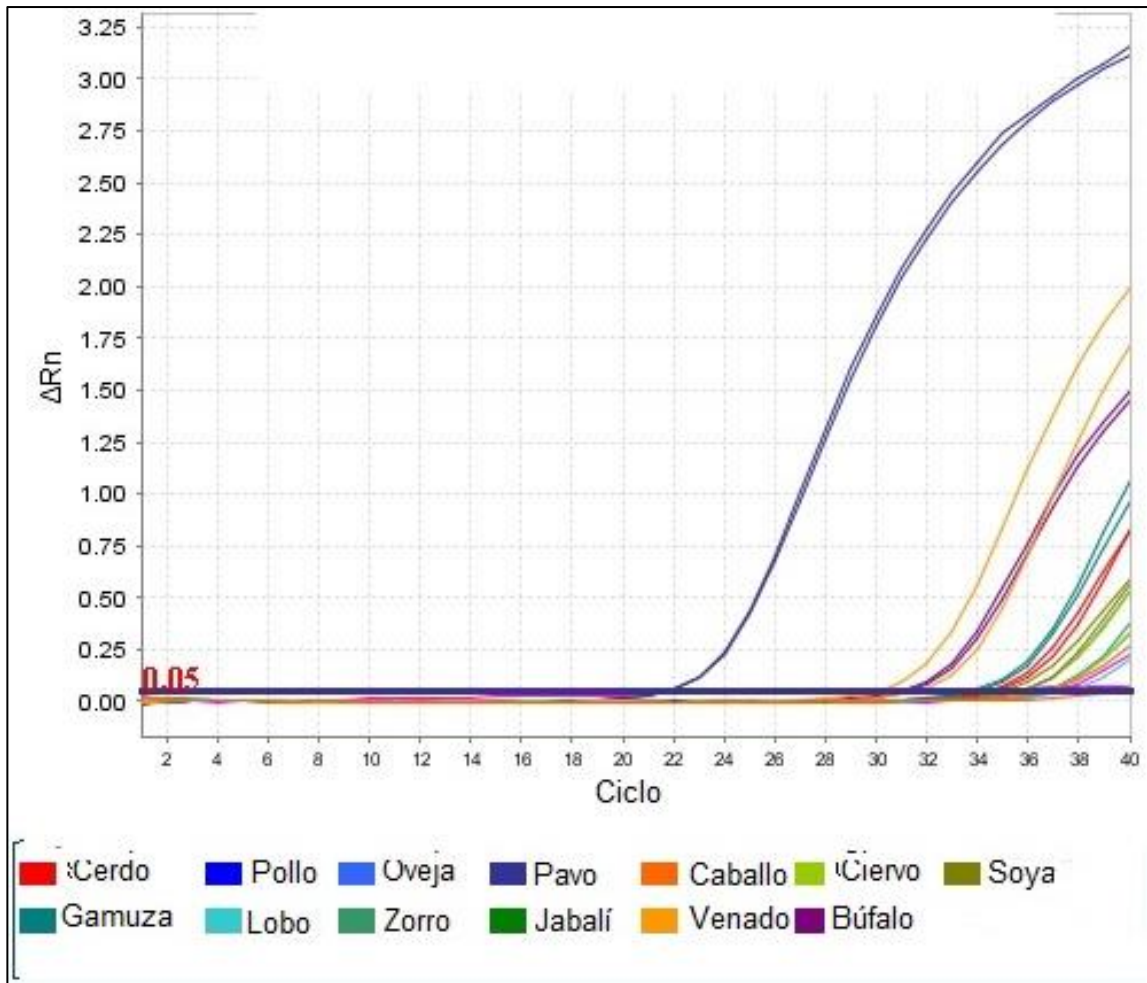


Figura 6. Prueba de especificidad de cebadores y sondas de hidrólisis para pavo

## 6.6. Detección y Cuantificación de ADN de Mezclas Cárnicas de Composición Conocida y Estándares de Jamones

Diversos trabajos similares han realizado distintos tipos de mezclas cárnicas a cuantificar. Iwobi *et al.*, (2015) realizó mezclas de carne molida con un peso final de 300 g, Soares *et al.*, (2013) realizaron mezclas de 100 g y Sawyer *et al.*, (2003) realizaron mezclas cárnicas de 5 g. Otros autores no citan el contenido en peso de carne en la mezcla, sólo citan la proporción que contenía (López *et al.*, 2011; Koppel *et al.*, 2008; 2011; Laube *et al.*, 2007). En el presente trabajo se optó por realizar mezclas de 1 mL a partir de homogeneizados cárnicos como se cita en la Tabla 7. Los resultados obtenidos para las 6 mezclas elaboradas en laboratorio, jamones comerciales y jamones elaborados en Planta Piloto se muestran en las Tablas 17, 18 y 19 respectivamente.

Tabla 17. Valores Ct y cantidad medida de las mezclas cárnicas

Mezcla	Cantidad medida (%)		Ct	
	Cerdo	Pavo	Cerdo	Pavo
B (99% cerdo/1% pavo)	145.5 ± 24.9	1.00 ± 0.11	23.33 ± 0.26	28.12 ± 0.15
C (90% cerdo/10% pavo)	113.9 ± 24.4	9.58 ± 0.55	23.69 ± 0.30	24.91 ± 0.07
D (70% cerdo/30% pavo)	68.69 ± 7.99	18.38 ± 3.51	24.29 ± 0.16	25.20 ± 0.27
E (50% cerdo/50% pavo)	49.38 ± 4.74	52.45 ± 4.25	24.72 ± 0.23	23.77 ± 0.15
F (30% cerdo/70% pavo)	30.16 ± 1.34	71.96 ± 15.19	25.14 ± 0.06	23.07 ± 0.28
G (10% cerdo/90% pavo)	11.82 ± 0.82	89.09 ± 9.37	26.38 ± 0.09	22.75 ± 0.14

Los análisis se realizaron por triplicado, la cantidad medida es el porcentaje de ADN en la reacción y se muestra la desviación estándar.

Tabla 18. Cantidad medida y valores Ct de jamones comerciales

Jamón Comercial	Especies declaradas	Cantidad (%)		Ct	
		Cerdo	Pavo	Cerdo	Pavo
H1	Cerdo	69.86±5.43	0	24.02±0.11	No amplificó
H2	Cerdo	72.08±2.56	0	23.97±0.05	No amplificó
H3	Cerdo	60.89±6.41	0	24.23±0.15	No amplificó
H4	Pavo	0	7.07±2.22	No amplificó	26.57±0.45
H5	Pavo y Cerdo	0	0	No amplificó	No amplificó
H6	Pavo y Cerdo	10.88±0.48	0	26.76±0.06	No amplificó
H7	Pavo y Cerdo	25.01±5.93	0	25.56±0.34	No amplificó
H8	Cerdo	38.45±5.83	0	24.91±0.22	No amplificó
H9	Pavo y Cerdo	17.79±0.22	80.11±12.62	26.03±0.02	22.86±0.22

Los análisis se realizaron por triplicado, la cantidad medida es el porcentaje de ADN en la reacción y se muestra la desviación estándar



Tabla 19. Cantidad medida y valores Ct para jamones elaborados en planta piloto

Jamón Estándar	Proporción (%)		Cantidad (%)		Ct	
	Cerdo	Pavo	Cerdo	Pavo	Cerdo	Pavo
J1	99	1	64.76±3.05	0.053±0.11	24.30±0.06	33.64±0.31
J2	75	25	69.75±2.27	0.60±0.5	23.93±0.04	29.73±1.01
J3	55	45	53.93±0.70	4.94±1.85	24.30±0.01	26.70±0.47
J4	50	50	64.11±5.24	5.35±0.83	24.33±0.11	26.81±0.21
J5	25	75	38.13±1.98	2.29±0.48	24.80±0.07	27.69±0.30
J6	1	99	0.45±0.07	19.83±2.26	31.40±0.23	24.97±0.15

Los análisis se realizaron por triplicado, la cantidad medida es el porcentaje de ADN en la reacción y se muestra la desviación estándar

En cuanto a la proporción cárnica que contienen las mezclas realizadas en el laboratorio, se asume que el blanqueo del amplicón de  $\beta$ -actina para el cerdo y prolactina para pavo es del 100%. Es decir, en una célula de ésta especie animal, el blanco es amplificado. Sin embargo, los resultados en la extracción de ADN indican que existe posibilidad de diferentes tamaños del genoma debido a la distinta cantidad de ADN aislado en cada ensayo. Además, se encuentra el factor de que el ADN se degrada por el tratamiento térmico de la muestra. La razón por la que en las mezclas B y C en las cuales la cantidad de ADN de cerdo sobrepasa el 100% se puede deber a este factor, en el cual encontremos mayor cantidad de secuencias las cuales fueron amplificadas y que en mezclas que se acercaban al 100% de contenido de cerdo arrojaron resultados similares.

Otros factores que pudieron afectar es que se haya agregado más cantidad del estándar y de esta manera se haya superado el punto más alto del rango dinámico establecido. También, el tiempo de homogeneizado pudo haber influido de manera que este no haya sido del todo uniforme, ya que la carne de cerdo por su naturaleza grasosa (Laube *et al.*, 2007) era más difícil realizar el homogeneizado y posteriormente aislar el ADN.

Los genes *Housekeeping* (HKGs) son aquellos que se requieren para el mantenimiento basal de las funciones celulares las cuales son necesarias para la existencia de la misma, a pesar de su rol específico en el tejido u organismo. Por ende, se espera que sean expresados en todas las células de un organismo bajo condiciones normales, sin discriminar el tipo de tejido, la etapa de desarrollo de la célula, o de alguna señal externa (Eisenberg *et al.*, 2013). Los HKGs que han demostrado tener un mayor control son los que codifican  $\beta$ -actina, gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, proteínas ribosomales entre otros (Jarczak *et al.*, 2014). En el caso del ensayo qPCR se blanquea un gen *Housekeeping* para el cerdo.

La razón de utilizar HKGs se considera importante porque se puede crear un factor de conversión para el tipo de tejido al que se esté aislando ADN.

Aunque en teoría se expresan al mismo nivel siempre y no varían de tejido, sigue siendo teórico y se han encontrado variaciones. En trabajos similares (Iwobi *et al.*, 2015; Koppel *et al.*, 2008; 2009; 2011; Laube *et al.*, 2007) se han calculado factores de conversión para el número de copias de ADN que se tienen por cada extracción y se relacionan con la proporción del tejido cárnico al que fue extraído. Sin embargo, resulta costoso realizar estas pruebas por la cantidad de reactivos para aislar ADN y realizar los ensayos qPCR, puesto que los factores de conversión se calculan por iteración hasta tener valores que se asemejen lo más posible a la realidad. La razón anterior también justifica el hecho de que algunas mezclas cárnicas, el valor medido no alcance al verdadero. Sin embargo, un coeficiente de variación del 25% entre repeticiones es aceptable en este tipo de trabajos (Iwobi *et al.*, 2015; Soares *et al.*, 2013; 2014; Koppel *et al.*, 2008; 2011), y otros trabajos han reportado que el valor medido por el sistema ha sobrepasado hasta 30% la cantidad verdadera de la mezcla (Koppel *et al.*, 2011).

En las mezclas cárnicas, las desviaciones estándar de las cantidades de ADN en cada ensayo resultaron muy bajas y con un coeficiente de variación que va desde el 6.9 al 17%, diferente a lo reportado por Koppel *et al.*, (2008). Esto también se puede deber a que el control de las mezclas cárnicas elaboradas en el laboratorio resultan ser más estrictas al ser un homogeneizado y sea en un volumen de 1 mL.

Para los jamones elaborados en Planta Piloto, los valores estimados no se asemejan a los valores verdaderos de los porcentajes de mezcla de las especies. Este contraste puede deberse a la complejidad de la matriz cárnica que muestran los jamones elaborados en Planta Piloto y que la homogeneización y muestreo de los mismos no fueron adecuados para el tipo de muestra. En la Figura 3 se muestran los pasos que se siguieron para realizar el muestreo del jamón para posteriormente ser homogeneizado en una licuadora con 150 mL de buffer PBS. En este caso, una homogeneización total de toda la pieza de jamón pudiera haber evitado las variaciones en cuanto a la

cuantificación de los tejidos de cerdo y pavo en el producto final. En algún punto del muestreo una mayor parte de músculo de cerdo y una menor de pavo (o viceversa) pudieron haberse tomado y no corresponder a la proporción de las mezclas elaboradas, por lo que debiese recomendarse que la homogeneización de la pieza sea completa debido al tipo de producto que se está utilizando.

Otra alternativa a las variaciones que presenta el proceso de elaboración del jamón horneado, sería recomendable sustituir la muestra, mezcla o matriz compleja por otro embutido más fino, donde la emulsión sea más homogénea, como es el caso de salchichas que corresponden al tipo de emulsiones finas, cuya homogeneización durante el proceso asegure la conservación de la proporción cárnica y evitar errores de muestreo durante el análisis para la validación del protocolo qPCR.

Iwobi *et al.*, (2015) llegaron a la conclusión de que no se deben realizar estándares de productos cárnicos para este tipo de ensayos. Debido a que en cada producto que se encuentre en el mercado la receta del mismo y las condiciones de procesamiento siempre van a variar. Esto es por darle una originalidad o sabor característico, presentación, etc. al producto que se comercialice y por cuestiones económicas, demandantes de tiempo y desgastantes del analista, no es factible realizar estándares de productos cárnicos. Más bien, la tendencia para mejorar estos ensayos es el de realizar los factores de conversión que se mencionaron anteriormente y realizar solo mezclas cárnicas del tejido que se declara en la etiqueta. Aun así, es importante destacar que en el sistema qPCR propuesto, el 1% (30 g en 3000 g) de la especie animal involucrada en los jamones elaborados en Planta Piloto fue detectable por el equipo. Por lo que la adulteración con alguna otra especie pudiera ser detectada con el sistema propuesto.

En cuanto a los jamones comerciales, se encontró que de aquellos que fueron citados contener solamente cerdo en su etiqueta, todos dieron positivos con esta especie y negativos con la de pavo. H5, H6, H7 y H9 especificaban contener pavo y cerdo, sólo uno cumplió con ambas especies animales (H9).

H6 y H7 contenían sólo cerdo y H5 no amplificó ninguna de las especies animales que decía contener a pesar de que se corroboró al someter dos veces más esta muestra al sistema (un duplicado y una nueva extracción de ADN a la muestra). Por lo anterior, H5, H6 y H7 no cumplen con la NOM al momento de clamar contener cerdo y pavo en su producto y con el sistema qPCR elaborado se ha detectado un posible fraude comercial.

El jamón H4 declara contener solamente pavo. Al resultar positiva la amplificación de esta especie, cumple con esta parte de la norma. Sin embargo, la cantidad arrojada por el sistema es de 7% aprox. La NOM permite la incorporación de soya y especias en su receta hasta un 10%, por lo que si se relaciona la cantidad de ADN directamente con la proporción cárnica, el producto no cumple con la NOM.

#### 6.7. Validación del Sistema qPCR, Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ)

El LOD es considerado como la mínima cantidad de analito detectado por el equipo con una incertidumbre razonable (95% de probabilidad usualmente). Sin embargo, se sugiere que el análisis de LOD se elabore bajo lineamientos internacionales (Bustin *et al.*, 2009) o a lineamientos para validar los métodos de análisis para la industria alimentaria (AFNOR, 2012). Otros trabajos no reportan el LOD ni bajo en qué criterios se estableció (Koppel *et al.*, 2008; 2011), otros validan el LOD realizando pruebas interlaboratorio o al momento de repetir el ensayo en otros laboratorios (Laube *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se observó que en los ensayos de jamones elaborados en laboratorio se detectaron 25 pg de ADN para el cerdo y 2.5 pg para el pavo, alcanzando un límite de detección de 0.1% y 0.01% respectivamente, esto bajo observación de los valores mínimos detectados en la curva. Los valores fueron reproducibles de manera interlaboratorio

(Laboratorio *Ricerca e Sviluppo* del *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale"*, Teramo, Italia y Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos y Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos en CIAD, Hermosillo, Sonora, México).

El límite de cuantificación se calcula con la linealidad del sistema, en el caso de la curva estándar dúplex, los valores del coeficiente de correlación ( $R^2$ ) fue de 0.994 para el cerdo y 0.997 para el pavo, por lo que la interpolación de la concentración de las muestras problemas se mantiene en un sistema lineal. El LOQ es la cantidad mínima que se puede cuantificar en relación a la curva estándar, y que la variación de la cuantificación sea razonable (90 a 110% de eficiencia comúnmente), aunque existen trabajos reportados con eficiencias de incluso 80% (Laube *et al.*, 2007). El LOQ se seleccionó debido a resultados de pruebas interlaboratorio y observando que el coeficiente de variación entre replicas fuera menor al 25% para permitir una cuantificación eficiente, siendo el LOQ 250 pg (1%) para el cerdo y 250 pg (1%) para el pavo.

La Tabla 17 muestra el valor medido y los valores verdaderos del porcentaje de las mezclas binarias del homogeneizado cárnico de cerdo y pavo. El valor obtenido es cercano a los valores verdaderos de las mezclas y se puede observar que hay una baja desviación estándar. Si se calcula el coeficiente de variación de la cantidad obtenida de ADN con cada mezcla, este resulta ser inferior al 25%, demostrando así la validez de indicar el valor verdadero por el sistema qPCR propuesto.

## VII. CONCLUSIONES

Se realizó la estandarización de la concentración óptima de cebadores y sondas de hidrólisis, así como las curvas de eficiencias para ADN sometido a tratamiento térmico. Además, el método de extracción, purificación y cuantificación de ADN se estandarizó para trabajar en un rango dinámico eficiente.

Se desarrolló el sistema dúplex qPCR para revelar ambas especies (cerdo y pavo) con 0.1% de límite de detección para cerdo y 0.01% para pavo. El límite de cuantificación observado para ambas especies fue de 1% en una mezcla cárnica bajo las condiciones establecidas por la NOM-158-SCFI-2003.

Con el protocolo qPCR elaborado fue posible identificar a la especie con mayor proporción de ADN involucrada en el producto cárnico (Jamón). Pero no fue posible cuantificar la proporción exacta del tejido de cada especie. En base a lo anterior se recomienda realizar nuevos estándares de mezclas cárnicas con los tejidos cárnicos propuestos por la NOM-158-SCFI, someterlas al sistema qPCR para poder establecer, por medio de iteración, factores de corrección de los valores de Ct y cantidad obtenidas respecto a la cantidad real de las mezclas. Y por último validar el sistema qPCR con un análisis estadístico riguroso como el estándar AFNOR y/o el análisis Probit.

## VIII. REFERENCIAS

AFNOR. (2012). Certification rules for the mark, validation of alternative analysis methods, application to the food industry. From: <http://www.afnor-validation.com>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2008). Molecular Biology of The Cell. 5<sup>a</sup> ed. Ed. Taylor & Francis, EUA. pp. 545-546.

Asensio, L., González, I., García, T. y Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Food Control 19(1): 1-8.

Ayaz, Y., Ayaz, N. D. y Erol I. (2006). Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Muscle Foods. 17(1): 214-220.

Ballin, N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. Meat Sci 86(3): 577-587.

Ballin, N. Z., Vogensen, F. K. y Karlsson, A. H. (2009). Species determination - Can we detect and quantify meat adulteration? Meat Science 83(2): 165-174.

Brodmann, P. D. and D. Moore (2003). Sensitive and semi-quantitative TaqMan (TM) real-time polymerase chain reaction systems for the detection of beef (*Bos taurus*) and the detection of the family Mammalia in food and feed. Meat Science 65(1): 599-607.



Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J. y Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55(4): 611-622.

Cammà, C., Di Domenico, M., y Monaco, F., (2012). Development and validation of fast Real-Time PCR assays for species identification in raw and cooked meat mixtures. *Food Control*. 23(1): 400-404.

Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Zel, J., y Gruden, K. (2006). Critical points of DNA quantification by real-time PCR – effects of DNA extraction method and simple matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*. 6:37

Chisholm, J., Conyers, C., Lawley, W., Hird, H. (2005). The detection of horse and donkey using real-time PCR. *Meat Science* 70(4): 727-732.

Chisholm, J., et al. (2008). The Development of Species-specific Real-time PCR Assays for the Detection of Pheasant and Quail in Food. *Food Analytical Methods* 1(3): 190-194.

European Commission (2002). Commission Directive 2002/178/EC. Official Journal of the European Communities, L31/1, Brussels

EURL. (2014) European Union Reference Laboratory for Animal Proteins in Feedingstuffs. Detection of horse DNA using real-time PCR. Disponible en: <http://eurl.craw.eu/en/187/method-of-reference-and-sops>

Dooley, J. J., Paine, K. E., Garrett, S. D. y Brown, H. M. (2004). Detection of meat species using TaqMan real-time PCR assays. *Meat Science*. 68(1): 431-438.

Dorak, T. (2006). Real-time PCR. Ed. Taylor & Francis. Reino Unido

Economía, S. d. (2013). Consulta de Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas. from <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/inicio.do>.

Eisenberg, E., y Levanon, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics*. 29(10): 569-574.

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Hernández, P. E., García, T., y Martín, R. (2006). PCR-RFLP Authentication of meats from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), roe deer (*Capreolus capreolus*), cattle (*Bos Taurus*), Sheep (*Ovis aries*), and goat (*Capra hircus*). *J. Agric. Food Chem.* 54: 1144-1150.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2013). Meat & Meat Products. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/home.html>

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P., García, T. y Martín, R. (2008). Real-time PCR for detection and quantification of red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*), and roe deer (*Capreolus capreolus*) in meat mixtures. *Meat Science* 79(2): 289-298.

Fajardo, V., González, I., Martín, I., Rojas, M., Hernández, P., García, T. y Martín, R. (2008). Real-time PCR for quantitative detection of chamois (*Rupicapra rupicapra*) and pyrenean ibex (*Capra pyrenaica*) in meat mixtures. *Journal of Aoac International* 91(1): 103-111.

Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T. y Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology* 21(8): 408-421.

Federación, D. O. d. I. (2013). NOM-158-SCFI-2003, Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba. Retrieved 11 de Abril de 2013, from [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5181684&fecha=14/03/2011](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5181684&fecha=14/03/2011).

González-Córdova, A. F., Hernández-Chávez, J. F., Sánchez-Escalante, A., Torrescano, G. R., Camou, J. P. y Vallejo-Cordoba, B. (2007). Técnicas

analíticas para la determinación de autenticidad de la carne y los productos cárnicos procesados térmicamente. *Nacameh* 1(2): 97-109.

González-Córdova, A. F., Calderón de la Barca, A. M., Cota, M. y Vallejo-Córdoba, B. (1998). Immunochemical detection of fraudulent adulteration of pork chorizo (sausage) with soy protein. *Food Science and Technology International* 4: 257-262.

Herrero, B., Royo, L. J., Lago, F. C., Vieites, J. M. y Espiñeira, M. (2013). Authentication of male beef by multiplex fast real-time PCR. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 30(2): 218-225.

Iqbal, A., Sun, D. y Allen, P. (2014). An overview on principle, techniques and application of hyperspectral imaging with special reference to ham quality evaluation and control. *Food Control* 46: 242-254.

Ireland, F. F. S. A. o. (2013). Results of burgers analysed, FSAI Food Safety Authority of Ireland.

Ireland, F. F. S. A. o. (2013). Results of Europe-wide beef product survey published. Retrieved 22 abril 2013, from [http://www.fsai.ie/news\\_centre/EU-wide\\_results\\_horsemeat\\_16042013.html](http://www.fsai.ie/news_centre/EU-wide_results_horsemeat_16042013.html).

Iwobi, A., Sebah, D., Kraemer, I., Losher, C., Fischer, G., Busch, U. y Huber, I. (2015). A multiplex real-time PCR method for the quantification of beef and pork fractions in minced meat. *Food Chemistry* 169: 305-313.

Jarczak, J., Kaba., J., y Bagnicka, E. (2014). The validation of housekeeping genes as a reference in quantitative Real Time PCR analysis, application in the milk somatic cells and frozen whole blood of goats infected with caprine arthritis encephalitis virus. *Gene*. 549: 280-285.

Jonker, K. M., Tilburg, H. C., Hägele, G. H. y de Boer, E. (2008). Species identification in meat products using real-time PCR. *Food Additives and Contaminants* 25(5): 527-533.

Karlsson, A. O. and G. Holmlund (2007). Identification of mammal species using species-specific DNA pyrosequencing. *Forensic Science International* 173(1): 16-20.

Kaupe, B., et al. (2004). DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *Journal of Dairy Research* 71(2): 182-187.

Köppel, R., Ruf, J. y Zimmerli, F. (2008). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, chicken and turkey. *European Food Research and Technology* 227(4): 1199-1203.

Koppel, R., Ruf, J. y Rentsch, J. (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. *European Food Research and Technology* 232(1): 151-155.

Koppel, R., Zimmerli, F. y Breitenmoser, A. (2009). Heptaplex real-time PCR for the identification and quantification of DNA from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. *European Food Research and Technology* 230(1): 125-133.

Koppel, R., Rentsch, J., Weibel, S., Ruf, J., Eugster, A. y Beck, K. (2013). Interlaboratory validation of two multiplex quantitative real-time PCR methods to determine species DNA of cow, sheep and goat as a measure of milk proportions in cheese. *Eur Food Res Technol.* 236(1): 217-227.

La Neve, F., Civera, T., Mucci, N y Bottero, M. T. (2008). Authentication of meat from game and domestic species by SNaPshot minisequencing analysis. *Meat Sci* 80(2): 216-224.

Laube, I., Spiegelberg, A., Butschke, A., Zagon, J., Schauzu, M., Kroh, L. y Broll, H. (2003). Methods for the detection of beef and pork in foods using real-

time polymerase chain reaction. *International Journal of Food Science and Technology* 38(2): 111-118.

Laube, I., Zagon, J., Spiegelberg, A. Butschke, A., Kroh, L. W. y Broll, H. (2007). Quantitative determination of commercially relevant species in foods by real-time PCR. *International Journal of Food Science and Technology* 42(3): 336-341.

Lockley, A. K. and R. G. Bardsley (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology* 11(2): 67-77.

López-Andreo, M., Aldeguer, M., Guillén, I., Gabaldón, J. A., y Puyet, A. (2012). Detection and quantification of meat species by qPCR in heat-processed food containing highly fragmented DNA. *Food Chemistry*. 134: 518-523

Lucena, S. A., et al. (2013). Miniaturization of hydrolase assays in thermocyclers. *Analytical Biochemistry* 434(1): 39-43.

Luthy, J. (1999). Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control* 10(6): 359-361.

Macedo-Silva, A., Shimokomaki, M., Vaz, J. A., Yamamoto, Y. y Tenuta-Filho, A. (2001). Textured soy protein quantification in comercial hamburger. *Journal of food composition and analysis*. 14(1): 469-478.

Mullis K., F. F., Scharf S., Saiki R., Horn G., & Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263 - 273.

Pascoal, 1., Prado, M., Castro, J., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J. (2004). Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. *Eur Food Res Technol*. 218(1): 306-312.

Premanandh, J. (2013). Horse meat scandal – a wake-up call for regulatory authorities. *Food Control*. 34: 568–569.

Rentsch, J., et al. (2013). Interlaboratory validation of two multiplex quantitative real-time PCR methods to determine species DNA of cow, sheep and goat as a measure of milk proportions in cheese. *European Food Research and Technology* 236(1): 217-227.

Rodriguez, M. A., et al. (2005). TaqMan real-time PCR for the detection and quantitation of pork in meat mixtures. *Meat Science* 70(1): 113-120.

Rojas, M., González, I., Pavón, M. A., Pegels, N., Hernández, P. E., García, T. y Martín, R. (2011). Development of a real-time PCR assay to control the illegal trade of meat from protected capercaillie species (*Tetrao urogallus*). *Forensic Science International*. 210(1): 133-138.

Sawyer, J., Wood, C., Shanahan, D., Gout, S., y McDowell, D. (2003). Real-time PCR for quantitative meat species testing. *Food Control*. 14: 579-583.

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P. y Mafra, I. (2014). Quantitative detection of soybean in meat products by a TaqMan real-time PCR assay

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P. y Mafra, I. (2013). A SYBR Green real-time PCR assay to detect and quantify pork meat in processed poultry meat products. *Meat Sci* 94(1): 115-120.

Tanabe, S., Hase, M., Yano, T., Sato, M., Fujimura, T., y Akiyama, H. (2007). A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(12): 3131-3135.

Valasek, M. A. and J. J. Repa (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29(3): 151-159.

Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V. y Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science*. 86(1): 193-213.

Woolfe, M., Gurung, T. y Walker, M. J. (2013). Can analytical chemists do molecular biology? A survey of the up-skilling of the UK official food control system in DNA food authenticity techniques. *Food Control*. 33(1): 385-392.

Zhang, C., Fowler, M. R., Scott, N. W., Lawson, G., y Slater, A. (2007). A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*. 18: 1149-1158.