

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

**EVALUACIÓN Y SELECCION DE MARCADORES  
MOLECULARES PARA LA TRAZABILIDAD DE LA CARNE DE  
BOVINO**

**POR:**

**ROBERTO RODRIGUEZ RAMIREZ**

**TESIS APROBADA POR LA  
COORDINACION DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTORADO EN CIENCIAS**

**HERMOSILLO, SONORA**

**DICIEMBRE DEL 2010**

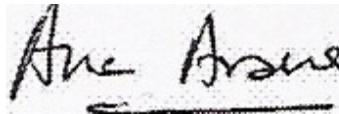
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de Roberto Rodríguez Ramírez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



---

**Dra. Belinda Vallejo Galland**  
Directora de Tesis



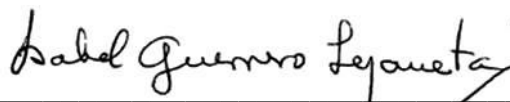
---

**Dra. Ana María Arana Navarro**



---

**Dra. Armida Sánchez Escalante**



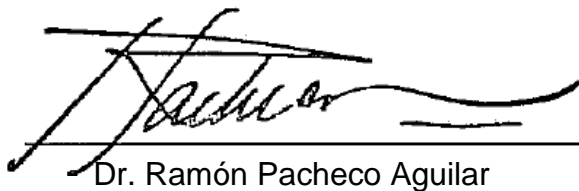
---

**Dra. María Isabel Guerrero**

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso del autor, siempre y cuando se dé el 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 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, A.C).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de datos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, de la Directora de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

## *AGRADECIMIENTOS*

*Al Consejo Nacional en Ciencia y Tecnología por permitirme y apoyarme a realizar mis estudios de posgrado*

*Al centro de investigación en alimentación y desarrollo A.C. en especial al laboratorio de autenticidad, calidad y trazabilidad de los alimentos, simplemente por abrirme la puerta y darme la oportunidad de integrarme a un gran laboratorio para que creciera en la ciencia de los alimentos.*

*A mi comité de tesis Dra. Belinda Vallejo, Dra. Ana Arana, Dra. Armida Sánchez, Dra. Isabel Guerrero por sus valiosas aportaciones y observaciones a este trabajo de investigación*

*A la coordinación de docencia por su apoyo y profesionalismo*

*Una vez más a la vida misma, por seguirme siendo ser parte de ella para que siga alcanzando y logrando ciertos fines que ni ella conoce.*

*A mi directora de tesis Dra. Belinda Vallejo por mi formación doctoral la amistad y sobre todo por confiar en mí en su grupo de trabajo al grado de animarme y/o llamarme la atención como si fuera uno de sus hijos...jeje Gracias.*

*Al cDr. Aarón González que desde un principio me ha mostrado su gran amistad, profesionalismo y sobre todo que lo considero como un familiar mas. Ni modo Aarón el chamaco será primero doctor jejeje, pero quizás no sin tu valiosa ayuda y con esa tenacidad que te destaca, gracias*

*A la Dra. Ana Arana por brindarme un pedacito de su amistad, sus conocimientos y dedicación hacia mi formación, pero sobre todo a liberarme de una de mis grandes frustraciones y convertirla en una ilusión, solo aquellos que sepan entenderán.... Muchas Gracias por todo Ana*

*A mis padres por darme la vida, a mi abuela Cecilia por todo su amor y a mis tíos, Norma y Gilberto a quien quiero y aprecio mucho*

*A mis hermanos, a quienes todavía son la crítica y el impulso a alcanzar nuevas metas*

*A esa personita que ha creído en mí, tanto en los logros y aun en mis carencias y que ha sido más que un pilar en mi vida académica, gracias Angélica.*

*A esas grandes amistades de la infancia y universidad: Samuel, Xavier, Raúl, Zupo, Josué, de los cuales demuestran su amistad día a día*

*A mis amigos de posgrado y de la institución en especial a Willy, Ronald, Toño, de los cuales son amistades que se alcanzan en cierta etapa de la vida, pero con alta sinceridad, donde el orden no importa..... Verdad willy jajajjjaj.*

*Al personal de la biblioteca Luis, Fernando, pero muy en especial a Don Gerardo por su valiosa ayuda.*

*Al grupo de investigación de lácteos, Dr. Adrian Hernández, M. en C. Carmen estrada, Dr. Miguel Ángel Mazorra, Dra. María Jesús torres. En especial a Carmen Estrada por su valioso apoyo técnico en el laboratorio y a*

*María de Jesús Torres por el manejo de las muestras durante mi etapa experimental*

*A mis compañeros del laboratorio de lácteos sin excepción alguna, en especial a Lilia Beltrán, Adrian Hernández por su buena amistad, consejos y momentos divertidos. Ya sé, no olvidó las extracciones... jajaja, creo que el triángulo sigue adrian, aunque estés en el otro continente, gracias*

*A mi querida pamplona, sobre todo a las amistades como Gabo, Mau, David, Ñakí, y las chicas súper poderosas del laboratorio: Paula, Joanna, Nuria, Maitea, Naiya y muchos más*

*A las personas que dijeron que pereza seguir estudiando y creemos que jamás te vayas Europa para lograrlo, muchas gracias por ser una inspiración de que fuera más tenaz para lograrlo*

*A la ciencia, que cada día nos sorprende más y sobre todo a los perseguidores de ella.*

*A todas las personas que hicieron que este trabajo pudieras salir adelante y que por una razón no se alcanzan a mencionar.*

## *DEDICATORIA*

*A mis padres, a quienes considero una de mis grandes aspiraciones*

*Y quizás ellos no lo sepan, Por que como padres no Solo me  
regalaron la vida Sí no han sabido a que la Preservará, con sus  
atenciones Infinitas en todos los ámbitos.*

*GRACIAS POR TODO*

*Raúl y Rosario*

*A Roberto Uriel, donde quizás realmente no tenga que dedicarle  
este trabajo, ya que simplemente es una razón para vivir y  
sacar mucha cosas adelante, como lo haría con cualquier hijo.*

*A una de las personas que más admiro, quiero y que me ha  
regalado un pedacito de su vida, como es la vida misma de mi  
hijo, gracias por comprenderme y ayudarme, porque sin tí nada  
hubiera sido posible, siempre te estaré agradecido,*

*Angélica*

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>Capítulo 1. Integración general</b> .....	1
<b>Capítulo 2. Review: Authentication and Traceability of Foods from Animal Origin by PCR-Based Capillary Electrophoresis</b> .....	19
<b>Capítulo 3. Trazabilidad de la Carne de Bovino: Conceptos, Aspectos Tecnológicos y Perspectivas para México</b> .....	47
<b>Capítulo 4. Meat Molecular Traceability for Beef from Mexican Bovine Synthetic Breeds</b> .....	54



## RESUMEN

La trazabilidad de la carne se define como la capacidad de rastreo a lo largo de toda la cadena productiva hasta el consumidor y viceversa. La ausencia de trazabilidad provocó el colapso de la ganadería bovina en Europa ante la presencia de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). Derivado de esto, la trazabilidad de la carne de bovino se convirtió en obligatoria para los mercados internacionales. El objetivo de este trabajo fue desarrollar e implementar un sistema de trazabilidad basado en marcadores moleculares para la carne proveniente de razas sintéticas de Sonora. Para lo anterior se recolectaron muestras de sangre y músculo de ganado bovino de dos ganaderías de Sonora y de sus puntos de venta. Se extrajo el ADN de las muestras recolectadas y se evaluaron 11 microsatélites, los cuales fueron analizados por electroforesis capilar. Todos los marcadores resultaron ser polimórficos, con un número de alelos entre 5 y 19. El contenido de información polimórfica (PIC) indicó que el microsatélite menos polimórfico fue el BM1824 (PIC= 65.2), mientras que el microsatélite mas polimórfico fue el BM2113 (PIC=84.2). Además, la probabilidad de correspondencia (MP por sus siglas en inglés) obtenida para los siete marcadores seleccionados (BM2113, TGLA53, INRA023, *ETH225*, TGLA122, TGLA227, ETH3) fue de  $10^{-8}$ . Finalmente, el sistema de trazabilidad molecular establecido demostró ser útil para determinar el origen de la carne.

# Capítulo 1

## Integración general

## INTRODUCCION

Desde finales de la década de los ochentas, se ha visto con preocupación una serie de crisis alimentarias originadas por la difusión de enfermedades como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o mal de las vacas locas, la encefalopatía espongiforme ovina, la fiebre aftosa y la peste porcina clásica (Pettitt, 2001; Felmer *et al.*, 2006). Aunado a lo anterior, también se ha generado desconfianza en los consumidores por la presencia de residuos de sustancias peligrosas en los alimentos, tales como las hormonas y anabólicos (Estrada-Montoya *et al.*, 2008), antibióticos (Sofos, 2008), pesticidas (Sallam y Ali Morshedy, 2008) entre otros. Todo esto ha causado gran alarma en muchos países, dada la facilidad con la que los problemas se diseminan debido a la globalización de los mercados (Pettitt, 2001; Felmer *et al.*, 2006).

Para rastrear a los alimentos problema implicados en crisis alimentarias y responder rápidamente en la recuperación del producto, las empresas y autoridades gubernamentales requieren de contar con herramientas suficientes que les permita dar solución a la problemática con la finalidad de salvaguardar la salud humana. Surge así la imperiosa necesidad de establecer políticas de identificación y seguimiento individual de los animales destinados a la

producción de alimentos mediante la aplicación de tecnologías adaptadas a la modernización y globalización de los intercambios comerciales. Con la identificación de los animales destinados a la producción de alimentos para consumo humano, empieza a tomar notoriedad el término **Trazabilidad** (Ammendrup y Füssel, 2001; Felmer *et al.*, 2006).

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, de un pienso, de un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinada a ser incorporada en alimentos humanos o con probabilidad de serlo”* (European Commission, 2002).

De forma general, la trazabilidad es un conjunto de acciones, medidas y procedimientos técnicos que permiten identificar y registrar cada alimento, desde su origen hasta el final de la cadena de comercialización (Felmer *et al.*, 2006; Yordanov y Angelova, 2006)

Para el caso específico de la carne, la trazabilidad permite seguir el rastro a un producto comenzando desde la identificación del animal en el campo, continuando en el frigorífico y terminando con la identificación de los productos y subproductos por medio del etiquetado en el punto de venta.

La identificación animal es una exigencia de los mercados externos, en los que el consumidor espera que el producto sea inocuo y de calidad diferenciada. También es imprescindible el rastreo del inventario nacional de ganado para preservar el estatus que hoy ostenta México como país libre de encefalopatía espongiforme bovina (BSE, por sus siglas en inglés) o “mal de las vacas locas”.

Por otro lado, la trazabilidad de la carne no solo es importante para la seguridad alimentaria, sino que también es importante para darle valor añadido a los productos como los que ostentan denominación de origen, identificación geográfica de procedencia o marcas de calidad diferenciada (Arana *et al.*, 2002; Dalvit *et al.*, 2007). La autentificación de los productos con marcas de calidad diferenciada es importante para evitar etiquetados fraudulentos y para certificar el origen de los productos en el mercado. Por lo anterior, la autentificación de alimentos que consiste en la identificación de sus componentes para verificar la veracidad del etiquetado es parte de la trazabilidad.

A partir del 2005, la Unión Europea (UE) exige trazabilidad para todos los alimentos importados y/o producidos en su territorio. No solo es necesario que se etiqueten los productos con su fecha de envase, caducidad y composición, también es necesario que se verifiquen todos los pasos seguidos en su procesamiento y origen (Schwagele, 2005). Por otro lado, países miembros de

la UE y países asiáticos como Japón y Corea han aumentado sus exigencias, al punto de requerir el **rastreo** o **trazabilidad** de los alimentos (Dalvit *et al.*, 2007).

Por otro lado, los países que quieren mantener un lugar competitivo en el comercio mundial de la carne (Australia, Nueva Zelanda, Brasil, Argentina, Uruguay y Chile) están instrumentando sistemas de trazabilidad en respuesta a la demanda de los consumidores de alto poder adquisitivo (Smith *et al.*, 2005).

En México, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) ha tomado acciones para darle valor a la cadena de bovinos de carne, orientándola hacia la nueva realidad de los mercados externos cada vez más estrictos en lo que respecta a sanidad, calidad e inocuidad. Entre las acciones tomadas por la SENASICA está la instalación de un sistema nacional de registro e identificación de animales denominado SINIIGA ([www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)).

Aunque todo sistema de trazabilidad para la carne comienza con la identificación de los animales y continúa con el etiquetado del producto en etapas posteriores de la cadena, la trazabilidad puede perderse con el sacrificio o ser susceptible de adulteraciones. Por lo anterior, con el propósito de verificar la trazabilidad de la carne, surge la trazabilidad molecular por medio del análisis del ADN (Pettitt, 2001; Smith y Saunders, 2005). Un sistema de trazabilidad

verificable con la huella genética podría ser una buena alternativa para empresas mexicanas exportadoras de carne que cuentan con un esquema de comercialización integrado.

## REFERENCIAS

Arana A, Soret B, Lasa I, Alfonso L (2002) Meat traceability using DNA markers: application to the beef industry. *Meat Sci.* 61: 367-373

Ammendrup S y Füssel AE (2001) Legislative requirements for the identification and traceability of farm animals within the European Union. *Rev Sci Tech.* 20: 437-444

Dalvit C De Marchi, M Cassandro M (2007) Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Sci.* 47: 437-449.

Estrada-Montoya MC, González-Córdova AF, Torrescano G, Camou JP, Vallejo-Cordoba B (2008) Screening and Confirmatory Determination of Clenbuterol Residues in Bovine Meat Marketed in the Northwest of Mexico. *Cien. Technol. Aliment.* 6: 130-136.

European Commission (2002) Council Regulation (EC) No 178/2002 of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off. J. Eur. Communities.* L31: 1-24.



Felmer R, Chavez R, Catrileo A, Rojas C (2006) *Arch Med Vet.* 38:197-206.

Pettitt RG (2001) Traceability in the food animal industry and supermarket chains. *Rev Sci Tech.* 20: 584-597.

Sallam KI, Morshedy AEM (2008) Organochlorine pesticide residues in camel, cattle and sheep carcasses slaughtered in Sharkia Province, Egypt. *Food Chem.* 108: 154-164

Schwägele F (2005) Traceability from European perspective. *Meat Sci.* 71: 164-173

Smith GC, Tatum JD, Belk KE, Scanga JA, Grandin T, Sofos JN (2005) Traceability from a US perspective. *Meat Sci.* 71: 174-193.

Smith GC, Saunders L (2005) International Identification, Traceability and Verification: The Key Drivers and The Impact on the Global Food Industry. International Livestock Congress Connections. *Exploring Traceability and What it Means to the Beef Industry.* Houston, TX, March 2.

Sofos, JN. (2008) Challenges to the meat safety in the 21<sup>st</sup> century. *Meat Sci.* 78: 3-13.

Yordanov D, Angelova G (2006) Identification and traceability of meat and meat products. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 20: 3-8.

## **HIPÓTESIS**

La selección y evaluación de microsatélites específicos para ganado bovino permitirá establecer un sistema molecular de trazabilidad para la carne producida en el Estado de Sonora.

## **OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un sistema de trazabilidad para la carne de bovino producida en el Estado de Sonora utilizando microsatélites específicos como marcadores moleculares

## **OBJETIVO ESPECIFICOS**

1. Establecer la metodología para la extracción de ADN genómico (ADNg) en tejido muscular y sangre del ganado bovino.
2. Establecer las condiciones de reacción para la amplificación de los diferentes microsatélites.
3. Establecer la metodología basada en electroforesis capilar para la separación y detección de los microsatélites.

4. Analizar estadísticamente los resultados de frecuencias alélicas, el grado de polimorfismo en los locus empleados, heterocigosidad y probabilidad de correspondencia.

## JUSTIFICACION

Para rastrear a los productos ante una alerta o crisis alimentaria, las organizaciones de productores y comercializadores, así como las dependencias oficiales competentes, requieren de herramientas suficientes que les permita identificar rápidamente el origen de los alimentos sospechosos. Ante este escenario se requiere de un sistema de trazabilidad total que permita aumentar la capacidad para determinar con precisión la fuente del problema, facilitar la recuperación y retirada de los productos afectados, establecer responsabilidades ante cualquier incidente, y finalmente reducir el impacto económico negativo sobre los integrantes de la cadena productiva. Lo anterior ha generado la urgente necesidad de establecer políticas de identificación y seguimiento individual de los animales destinados al consumo, mediante la aplicación de nuevas tecnologías adaptadas para dar respuestas en tiempos cortos, acordes con la modernización y globalización de los intercambios comerciales actuales. Lo anterior hace que hoy en día, el término trazabilidad, sea parte del lenguaje común dentro de la cadena de producción, industrialización y comercialización de los alimentos. Así la trazabilidad al tener la capacidad de rastrear la cadena de producción, otorga a los productores la posibilidad de colocar sus productos en mercados más rentables, que exigen conocer con certeza el origen del alimento. En México, la trazabilidad de la

carne con la huella genética complementaría los esfuerzos realizados en materia de trazabilidad como lo es la aplicación del SINIIGA, asegurando de manera fehaciente la certificación de origen de la carne. Sin embargo, con el sacrificio del animal y su posterior despiece, la trazabilidad se pierde. Por lo que su complementación con un sistema de trazabilidad molecular (basada en ADN) daría un valor agregado a la cadena de bovinos de carne, permitiendo ser más competitivos en los mercados internacionales.

Aunque la trazabilidad molecular para la carne de bovino se ha establecido en diferentes países, la mayoría de estos sistemas de trazabilidad se ha desarrollado para razas puras. Sin embargo, la trazabilidad molecular no ha sido reportada para razas sintéticas, como las que predominan en Sonora y en general en todo México. Por lo anterior, se planteó el desarrollo e implementación de un sistema de trazabilidad molecular considerando las razas sintéticas de bovino utilizadas para la producción de carne en Sonora.

## METODOLOGIA

En el capítulo 2 se presenta un artículo de revisión relacionado con la autenticación y trazabilidad de los alimentos de origen animal utilizando técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y electroforesis capilar. Dentro de esta revisión, destacan aplicaciones de estas dos técnicas en la trazabilidad de la carne de bovino por medio del uso de plataformas de secuenciación basadas en electroforesis capilar. En capítulo 3 se presenta un artículo de revisión describiendo un panorama general de conceptos, aspectos tecnológicos y normativa para la trazabilidad de la carne de bovino. Además se describen los principales métodos utilizados para la trazabilidad, incluyendo la selección y evaluación de marcadores moleculares a utilizar en la trazabilidad molecular. Por último, se presentan las perspectivas de la trazabilidad en diferentes países, enfatizando el caso de México.

En el **capítulo 4** se describe la metodología seguida para el sistema de trazabilidad molecular propuesto para la carne de bovino proveniente de razas sintéticas de Sonora. Primeramente, se establecieron los parámetros para la amplificación de los marcadores moleculares por medio de PCR y las condiciones de separación de los mismos por medio de electroforesis capilar utilizando un secuenciador. Además se describe la probabilidad de

correspondencia, la heterocigosidad media y el contenido de información polimórfica (PIC por su siglas en ingles) obtenidos para la población muestreada. En base a estos parámetros, se seleccionaron los marcadores que arrojaron mayor información para ser utilizados en la trazabilidad molecular. Finalmente, se demostró la aplicabilidad del sistema para la trazabilidad molecular de la carne de bovino de Sonora.

El sistema de trazabilidad molecular propuesto dentro de este trabajo de investigación (Figura 1) consistió, de manera general, en tomar muestras de sangre y tejido en el animal (al momento del sacrificio) como muestras de referencia. Posteriormente se tomaron muestras en los puntos de venta en donde se comercializó la carne de los animales muestreados en el sacrificio. Las muestras así recolectadas fueron sometidas a la extracción del ADN para obtener su huella genética mediante la amplificación de los microsatélites seleccionados. Los resultados fueron interpretados de tal manera que se obtuvieron perfiles alélicos para las muestras de referencia y las coleccionadas en los puntos de venta o muestras problema. Para establecer el origen de la carne, se compararon los perfiles alélicos de las muestras problema con los de las muestras de referencia, para determinar si ambas huellas genéticas fueron idénticas o no.



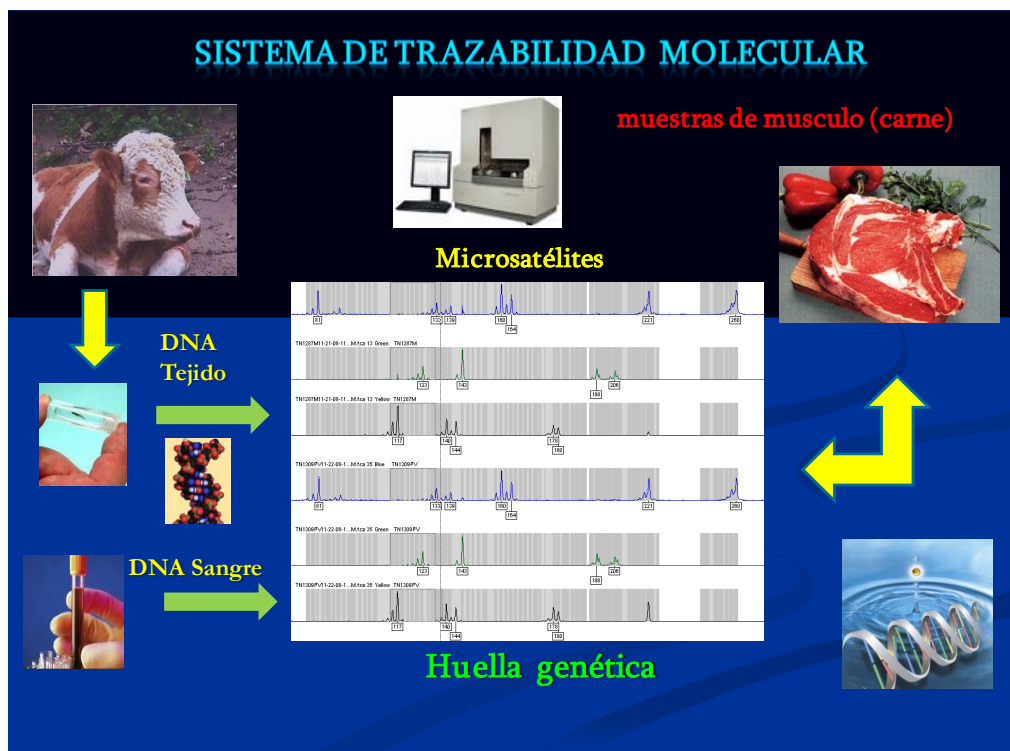


Figura 1. Esquema general del sistema de trazabilidad molecular propuesto

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este estudio se evaluaron 11 microsatélites en muestras de sangre y músculo de bovino para ser evaluados por su poder de discriminación en un sistema de trazabilidad molecular. Se obtuvieron entre 4 y 19 alelos con tamaños de fragmentos en los rangos de pares de bases anteriormente reportados para estos microsatélites. Asimismo se encontró que las huellas genéticas obtenidas de las muestras de carne en los puntos de venta y matadero coincidieron para todos los marcadores propuestos en el estudio.

El marcador BM2113 mostró el mayor contenido de información polimórfica (PIC) con un valor de 84.2. Por otro lado, el marcador BM1824 mostró el menor contenido de información con un valor de 65.2, por lo que fue el marcador menos informativo para las razas sintéticas evaluadas. Además se obtuvo una MP de  $1.149 \times 10^{-11}$  para los 11 marcadores evaluados. Aunque todos los marcadores evaluados aportaron información útil para la discriminación de las muestras, la trazabilidad molecular de la carne de bovino de las razas bajo estudio podría llevarse a cabo con 7 marcadores seleccionados (BM2113, TGLA53, INRA023, *ETH225*, TGLA122, TGLA227, *ETH3*) en base a su mayor PIC (MP de  $10^{-8}$ ).

Finalmente, el sistema de trazabilidad molecular establecido demostró ser útil para determinar el origen de la carne. La verificación de la trazabilidad por medio de la huella genética podría ser una herramienta muy útil para la comercialización de la carne de Sonora con calidad diferenciada.

# Capítulo 2

## **Review: Authentication and Traceability of Foods from Animal Origin by PCR-Based Capillary Electrophoresis**

**Artículo enviado y aceptado en la revista Analytica chimica Acta**

1     **Review: Authentication and Traceability of Foods from Animal Origin by**  
2                     **PCR-Based Capillary Electrophoresis**

3             Roberto Rodríguez-Ramírez, Aarón F. González-Córdova & Belinda  
4     Vallejo-Cordoba\*

5  
6             Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos  
7             Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD)  
8             Carretera a La Victoria Km 0.6, Apartado 1735  
9             Hermosillo, Sonora, 83304. Mexico

10    E-mail addresses: [robertorodriguez@estudiantes.ciad.mx](mailto:robertorodriguez@estudiantes.ciad.mx) [aaronglz@ciad.mx](mailto:aaronglz@ciad.mx)  
11                                     [vallejo@ciad.mx](mailto:vallejo@ciad.mx)

12             Corresponding author: Belinda Vallejo-Cordoba

13             Phone: +52 (662) 289-2400 Local 303

14             Fax: +52 (662) 280-0421

15             E-mail address: [vallejo@ciad.mx](mailto:vallejo@ciad.mx)

16

17             Key words: food authentication and traceability, food DNA, capillary  
18                                     electrophoresis

19

20             Manuscript submitted to the Editor of *Analytica Chimica Acta* for evaluation.

21

October, 2010

22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

**Abstract**

This work presents an overview of the applicability of PCR-based capillary electrophoresis (CE) in food authentication and traceability of foods from animal origin. Analytical approaches for authenticating and tracing meat and meat products and fish and seafood products are discussed. Particular emphasis will be given to the usefulness of genotyping in food tracing by using CE-based genetic analyzers.

43 **1.- Introduction**

44 The strategic development of a food chain approach to food quality and safety  
45 must be considered within a global context that is constantly evolving in terms of  
46 normative and requirements. Particularly, food control has switched to a more  
47 integrated and preventive approach demanded by food trade globalization [1]. In  
48 this context, food traceability main drivers are food safety/risk management and  
49 authentication to prevent fraudulent labeling and to certify the origin of products  
50 in the market.

51 Traceability emerged as a “watch-word” for consumer and regulatory confidence  
52 with respect to food quality and food safety along the supply chain from  
53 production, processing and retailing from the point of origin to the point of sale  
54 [2]. On the other hand, authenticity of a food product is essentially defined by  
55 legally recognized descriptions that concern its characteristics (quality, origin,  
56 process, etc.) [3]. Food authentication, which is part of food traceability, consists  
57 in the identification of food components to verify compliance with food labeling to  
58 prevent economic fraud. With respect to traceability along the full supply chain of  
59 foods of animal origin, several aspects are of importance. They shall, if possible,  
60 give information on animal species, origin, authenticity, composition, age and  
61 production systems [4]. Consequently, it is necessary to have reliable methods,  
62 which allow fast and unequivocal information related to these issues.

63 In recent years, growth in food authentication methods based on DNA analysis  
64 was due to the public health concern associated with the BSE (bovine  
65 spongiform encephalopathy) crisis [5]. The greatest amount of research on the  
66 application of the polymerase chain reaction (PCR) for the authentication of food  
67 samples involves the analysis of meat and meat-based products [5]. DNA-based  
68 techniques are preferred since DNA is a persistent molecule during food  
69 processing and can retain sequence specific information retrievable by a simple  
70 amplification reaction [6]. In fact, an overview of PCR-based methods with  
71 numerous applications for animal species identification was published in 2008;  
72 however, most applications included conventional gel electrophoresis [7]. On the  
73 other hand, the combined use of molecular techniques together with CE take  
74 advantage of the high specificity and sensitivity of the former and the high  
75 resolving power and automation of the later.

76 It has been in the last decade that applications of PCR-based capillary  
77 electrophoresis (CE) in foods analysis have increased substantially. PCR-based  
78 CE for meat species identification, food borne pathogens and genetically  
79 modified organisms (GMO) were first reviewed in 2004 and 2005 [8,9]. Later,  
80 updates on the analysis of DNA by CE were presented in reviews on the  
81 application of capillary electromigration methods for the identification of  
82 foodborne pathogens, GMO and wine authenticity [10-12]. Although in these  
83 reviews [10-12], several applications of PCR-based CE methods were



84 addressed; their focus was mainly on foods of plant origin and foodborne  
85 pathogens and not on foods of animal origin. Authenticity and traceability of  
86 foods of animal origin such as meat and meat products and fish and seafood are  
87 extremely important since these are highly priced foods that are often  
88 susceptible to adulteration. Therefore, in this review, special emphasis will be  
89 given to the analysis of authenticity and traceability issues dealing with food  
90 products of animal origin by PCR-based CE methods.

91

## 92 **2.- Authenticating and tracing particular foods**

93 The first critical step in the development of PCR-based electrophoretic methods  
94 relies on DNA extraction and purification from food samples since it requires  
95 stringent protocols [13]. To this end, the influences of DNA extraction methods  
96 and PCR inhibitors on efficient recovery of nucleic acids from foods were  
97 reported [14, 15]. As a result, these studies highlighted the importance of  
98 selecting appropriate extraction and purification strategies depending on food  
99 composition before CE could be carried out.

100 The next critical step is PCR amplification which in its simplest form consists in  
101 the amplification of one fragment followed by electrophoresis [7]. Other more  
102 discriminatory techniques consist in the analysis of digested fragments by  
103 restriction endonucleases (PCR-RFLP), fragment analysis by sequencing  
104 technologies, simultaneous amplification of two or more fragments with primer

105 pairs (multiplex PCR) and the analysis of single strand conformation  
106 polymorphisms (PCR-SSCP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and  
107 single sequence repeats (SSR), also known as microsatellites [7]. Also, several  
108 food DNA-based analyses were carried out in microchips with the purpose of  
109 making the analysis automated [16].

110 Finally, because DNA fragments of different sizes have constant charge to mass  
111 ratios, separations by CE have been carried out in uncoated capillaries with  
112 different water soluble polymers used in run buffers for providing a sieving effect  
113 and laser induced fluorescence (LIF) detection [17].

114

## 115 **2.1.- Foods of animal origin**

### 116 **2.1.1.- Meat and meat products**

117 Consumer concerns over food safety issues such as traceability of animal origin  
118 and authenticity of meat products are driving the requirement for reliable  
119 analytical methods [18]. DNA-based techniques offer the greatest potential  
120 because DNA is stable and not tissue dependent [18]. In 2005, a review on  
121 analytical developments on meat authentication reported only two PCR CE-  
122 based applications [17]. Therefore, although the potential of CE in food analysis  
123 and food authentication was recognized, its application to meat and meat  
124 products was limited [17]. Today, PCR-based CE analytical methods of meat  
125 and meat products are scarce, with greatest increase shown on meat

126 authentication [19-24] and meat traceability using CE-based sequencers [25, 27-  
127 29].

128 The first important issue to be addressed in the analytical process is the quality  
129 and quantity of DNA since cooking, storing and processing of meat and meat  
130 products may affect its integrity. Therefore, the quality and quantity of DNA  
131 isolated from samples cooked with temperatures ranging from 75 to 100 °C was  
132 studied [18]. Cooking meat to high temperatures resulted in a reduced overall  
133 DNA yield and probable fragmentation of DNA to sizes lower than 800 bp. In this  
134 work, nuclear DNA fragments of sizes larger than 150 bp from muscle samples  
135 cooked to internal temperatures of up to 100 °C were successfully amplified.  
136 This test was promising for traceability applications in cooked meat by  
137 examining nuclear microsatellites and other markers. According to these  
138 authors, this might permit traceability of cooked meat to the individual animal  
139 level, which was not possible with mitochondrial DNA sequences [18].

140 On the other hand, most researchers focused on mitochondrial DNA PCR  
141 assays for meat authentication since it was easier to amplify mitochondrial  
142 genes from degraded DNA samples because of their greater copy number [18].  
143 However, species-specific primers could not be designed when species were  
144 very closely related. In these cases, it was advisable to apply techniques such  
145 as PCR-RFLP which were based on the analysis of single species-specific  
146 mutations (site of diagnosis). To this end, the use of mitochondrial universal

147 cytochrome b (cyt b)-targeted primers in PCR-RFLP assays revealed the  
148 existence of a complex restriction pattern in three genetically-unrelated Iberian  
149 cows, this being due to the simultaneous co-amplification of two 359 bp cyt b  
150 fragments. The new co-amplified fragment was sequenced and exhibited a high  
151 homology with mitochondrial sequences previously described for other cattle  
152 specimens [19]. Therefore, the results of this work showed that food  
153 authentication studies by PCR-RFLP analysis might be complicated in the case  
154 of cattle since there was co-amplification of two different cyt b fragments [19].  
155 Also, the suitability of terminal restriction fragment length polymorphism (T-  
156 RFLP) for identifying meat animal species was assessed [20]. In this study, the  
157 mitochondrial 12S rRNA gene was PCR amplified with fluorescent-labeled  
158 primers in 12 common economically important animal species (pig, cattle, goat,  
159 sheep, horse, chicken, salmon, deer, buffalo, sturgeon, turkey and dog). PCR  
160 products were digested with restriction endonucleases and only the terminal  
161 restriction fragment containing a labeled primer with a fluorescent dye was  
162 detected on a CE system ABI 3130 [20].  
163 In T-RFLP analysis, the fluorescent-labeled terminal fragments were separated  
164 on a high-resolution CE system using a 50 cm capillary and the POP6<sup>TM</sup> polymer  
165 from Applied Biosystems. The sizes of the fluorescent-labeled terminal  
166 fragments were assessed using a size standard and a specific software [20].  
167 These automated systems could provide a digital output that yielded more

168 accurate and objective results than PCR-RFLP. Furthermore, T-RFLP usually  
169 analyzed one or two band(s) patterns since only fluorescent-labeled terminal  
170 fragments could be detected. In contrast, PCR-RFLP produced a multiple band  
171 pattern that might lead to variable results [20]. According to these authors, the  
172 main limitation of PCR-RFLP was the difficulty in accurately estimating the  
173 fragment length due to the limited resolving power of gel electrophoresis and the  
174 DNA markers commonly used. However by using CE sequencers this problem  
175 was avoided [20].

176 Although PCR-RFLP was useful for meat species identification purposes and its  
177 applicability had gone from the gel to the capillary format [20], to meet the  
178 demands for miniaturization of analytical instruments, the microchip-based CE  
179 technology was also tested for this purpose [21]. In consequence, a lab-on-chip  
180 technology was established by assembling and adapting previous PCR-RFLP  
181 techniques developed on the mitochondrial 12S rRNA gene for the identification  
182 of different game and domestic meat species [21].

183 A conserved fragment of approximately 720 bp from genomic DNA was  
184 amplified from meats of red deer, fallow deer, roe deer, chamois, mouflon,  
185 pyrenean ibex, goat, sheep, cattle and swine species, and subsequent  
186 enzymatic digestions of the amplicons were carried out for meat differentiation.  
187 The visualization of fragment profiles was carried out using a DNA 1000  
188 LabChip with the Agilent 2100 lab-on-a-chip system. The DNA1000 LabChip

189 allowed good discrimination of DNA fragments ranging from 25 to 1000 bp,  
190 which were detected using a fluorescent DNA-binding dye and laser-induced  
191 fluorescence; fragment sizing was achieved by comparison to DNA size  
192 markers. These authors showed that identification of the ten game and domestic  
193 meats studied using the Agilent 2100 Bioanalyzer was feasible and provided an  
194 improvement on PCR-RFLP fragment resolution and detection in comparison  
195 with the conventional method using agarose gels [21]. Furthermore, by using the  
196 DNA1000 LabChip, up to 12 samples could be tested in a single run, taking 1-2  
197 h from start to finish [21].

198 For closely related species and when several species have to be differentiated  
199 simultaneously, the use of many restriction enzymes and analysis of more than  
200 one diagnosis site make PCR-RFLP difficult to automate. Therefore, other  
201 techniques such as sequencing were suggested. An assay for species  
202 identification of game meats from roe and red deer, steinbock and chamois was  
203 developed based on a minisequencing reaction and capillary electrophoresis of  
204 a conserved fragment from the mtDNA cyt b gene [22]. The minisequencing test  
205 was as precise and reliable as the sequencing test; moreover, it had the  
206 advantage of being quicker allowing immediate interpretation of results.

207 The main benefit of the minisequencing strategy was the use of a mutation  
208 analysis protocol based on a common procedure, irrespective of the mutations  
209 involved. The assay was also intended to enable the differentiation between

210 these wild meats and those from buffalo, sheep, goat, cattle and swine domestic  
211 species, which could be sold in place of more expensive venison meat [22].  
212 Accordingly, minisequencing products were electrokinetically injected and  
213 electrophoresed in a 47 cm length capillary column using the POP-4 polymer  
214 from Applied Biosystems in a CE-based sequencer ABI 310 Genetic Analyzer  
215 and all results from the multiplex PCR test were confirmed by fragment  
216 sequencing. As an example of the high resolving power of this technique,  
217 species-specific patterns observed for the different nine species showing six  
218 peaks for red deer, roe deer, steinbock, chamois, goat and sheep, five peaks for  
219 buffalo and three peaks for swine and bovine were shown in Figure 1. The  
220 assay allowed the possibility of discriminating nine species at the same time  
221 [22].

222 Although, the application of the above test was simple and straightforward for  
223 the analysis of animal tissues, the analysis of meat mixtures was problematic. In  
224 contrast, the non-coding mtDNA control region (CR), also called d-loop region in  
225 vertebrates had a higher mutations rate than the other mitochondrial coding  
226 regions. Therefore, sequence data from the CR were more effective than cyt b  
227 and other mitochondrial coding regions for the identification of closely related  
228 species [23]. Therefore, the analysis of mtDNA CR length polymorphism was  
229 applied to the molecular identification of mammalian species when the DNA of  
230 several species was present in a mixture. In this study, the DNA from 18 species

231 of mammals was experimentally combined in order to produce templates with  
232 mixtures of two or three species [23]. A single universal primer pair was then  
233 used to amplify a portion of the left domain of the CR and the size of the  
234 resulting PCR products were compared with the expected sizes of homologous  
235 DNA sequences from reference databases [23]. Amplicons were separated and  
236 visualized either on agarose gels or using CE in a Genetic Analyzer ABI Prism  
237 310 capillary system. However, CE was more appropriate for resolving such  
238 complex mixtures, since its higher sensitivity allowed detection of minor  
239 components within the mixtures that were not visible on agarose gels [23].

240 In addition to animal species identification, to discriminate between Japanese  
241 (domestic) and Australian (imported) beef, DNA markers were analyzed by  
242 PCR-RFLP [24]. According to these authors, the probability of identifying  
243 Australian beef was 0.93 and the probability of misjudgment was 0.017 using six  
244 selected markers [24].

245 Finally, perhaps the most important application of PCR-based CE methods for  
246 meat and meat products authentication was related to tracing a particular meat  
247 product back to the animal from where it came from. Traceability systems  
248 usually revolved around devices that were attached to an animal such as ear  
249 tags or to a piece of meat such as labels. However, because DNA was unique to  
250 an individual, it was a useful tool for proof of identity and/or audit in meat  
251 traceability systems [25]. Matching between the DNA profiles of the two



252 samples meant that the declared origin of the meat was correct or not [25]. Any  
253 DNA-based traceability system required that reference samples were available  
254 from any animal for which traceability might be required, and that these  
255 reference samples were stored in a way that they could be easily accessed.  
256 When a DNA sample was taken from a test item, the test and reference samples  
257 were assayed for a set of genetic markers [25]. The simplest relationship to test  
258 was that the samples were from the same individual i.e., a test for identity [25].  
259 For this purpose, usually microsatellite or short tandem repeats (STR) were  
260 analyzed by capillary electrophoresis-based genetic analyzers either one  
261 capillary or multi-capillary systems [26-28].

262 Analysis for meat traceability started with DNA extraction from the meat of  
263 individual animals by different isolation protocols [26-29]. Then, PCR products of  
264 microsatellite markers, which were those recommended by the International  
265 Society for Animal Genetics (ISAG) for cattle parentage testing, were analyzed  
266 by capillary electrophoresis-based genetic analyzers and the resulting profiles  
267 were interpreted by a software available with the instrument [26-28]. Also,  
268 genetic traceability of European wild boars and Iberian and Duroc pigs based on  
269 the identification of mitochondrial markers was carried out by a capillary  
270 electrophoresis-based genetic analyzer [29].

271 One of the microsatellite primers was labeled with a fluorescent dye that  
272 enabled detection of the resulting PCR product following amplification. PCR

273 products were separated by size and dye color using electrophoresis followed  
274 by laser-induced fluorescence with multiwavelength detection. An internal  
275 standard, containing DNA fragments of known size and labeled with a different  
276 dye color, was typically electrophoresed with each sample to calibrate sizes  
277 from run to run and separations were carried out with commercially available  
278 polymers such as POP-4 as a sieving matrix [30].

279 Cattle meat traceability studies mainly differed on the number of microsatellites  
280 used, optimization of PCR conditions aiming at carrying out multiplex reactions  
281 and sample type [26-28]. In general, the DNA marker system used should be  
282 powerful enough so that matching a test to a reference sample from an  
283 individual other than its correct source is rare. In fact, the best panel of  
284 microsatellites might differ according to the breed [26]. In one study, 21  
285 microsatellites were tested for breed identification in four native Italian beef  
286 breeds with the purpose of assigning individuals to the breed of origin for quality  
287 certification of livestock production [27]. The marker sets with the highest gene  
288 diversity were shown to perform best and only 52.5% of the genotypes were  
289 correctly allocated. As a result, the same group evaluated 12 microsatellites in  
290 six Italian cattle breeds aiming at reducing the costs of the analysis but  
291 considering genetic differentiation among them [28]. These authors found that a  
292 set of 8 microsatellites showed reliable results [28]. Moreover, microsatellite  
293 genotyping was also useful as a potential tool for DNA-based tracing ground

294 beef mixtures prepared from less than 10 individuals [25]. These authors  
295 concluded that genotyping of mixtures became less effective as the number of  
296 individuals represented in the mixture increased [25].

297

#### 298 2.1.2.- Fish and seafood products

299 There is an increasing requirement for traceability of fish and fish products, both  
300 for consumer protection and for regulatory enforcement, in particular with  
301 respect to illegal, unreported and unregulated (IUU) fishing [31]. Also, the illegal  
302 mislabeling of fish and seafood species can have detrimental effects on both the  
303 industry and the consumer. To prevent these problems, which include economic  
304 fraud and health hazards, a research priority has been the development of fish  
305 species authentication methods that are reliable and rapid [32]. Consequently, a  
306 variety of DNA-based techniques were developed, including multiplex PCR,  
307 PCR-RFLP, PCR-RAPD, PCR-AFLP, PCR-SSCP and FINS (Forensically  
308 informative nucleotide sequencing), which were based on genetic  
309 polymorphisms in the genetic codes of different species [32]. Most DNA-based  
310 methods for fish species identification consisted in the amplification of  
311 mitochondrial DNA, although nuclear DNA markers were also examined, with  
312 the most prominent being the mitochondrial gene *cyt b* [7, 31-35].

313 Authentication of fish and seafood species by DNA-based techniques was the  
314 topic of various reviews [7, 32-35]. According to a 2009 review on molecular

315 identification methods of fish species identification, most of the 153 studies  
316 reported mainly focused on three methods: PCR-RFLP, PCR-sequencing and  
317 PCR-specific primers, while PCR-SSCP, PCR-RAPD, PCR-DGGE, PCR-AFLP,  
318 and cloning and sequencing had barely been used [35]. While most of these  
319 methods used conventional gel electrophoresis, among PCR-sequencing  
320 methods, PCR-based CE was used the most for fish and seafood species  
321 identification [36-44]. Reports related to this subject previous to 2005 were  
322 reviewed by others [7, 32-34], thus this overview only includes from 2005 to  
323 date. Another format of PCR-based CE used for fish species authentication was  
324 using lab-on-a-chip technology [45-46].

325         The most direct means of obtaining information from PCR products was  
326 by sequencing [34]. Therefore, information obtained had been used to identify  
327 various fish [36-42] and mollusks [43-44]. A multiplex primer-extension (PER)  
328 assay for the differentiation of the five major tuna species (*Thunnus alalunga*,  
329 *Thunnus albacares*, *Thunnus obesus*, *Thunnus thynnus* and *Katsuwonus*  
330 *pelamis*) was developed. This technique was based on the simultaneous  
331 analysis of four diagnosis sites included in a fragment of mtDNA-cyt b amplified  
332 by PCR. Then, fluorescently labeled primers with different dyes allowed the  
333 identification of the specific diagnosis sites by using a CE-based genetic  
334 analyzer equipped with a 47-cm capillary column and using POP 4 polymer as  
335 the run buffer [36]. A species specific patterns observed in five raw tuna

336 samples is presented in Figure 2. The applicability of the multiplex PER assay to  
337 commercial canned tuna samples was demonstrated. In fact, it was possible to  
338 confirm the species indicated in the label for eleven samples as well as to  
339 establish the fish species for the nineteen samples whose label brought the  
340 general indication “tuna”. All of the results of the multiplex PER test were  
341 confirmed by fragment sequencing [36].

342 Forensically informative nucleotide sequencing (FINS) was carried out by  
343 amplifying a specific gene fragment from mitochondrial cyt b, its nucleotide  
344 sequence was determined by a CE-based genetic analyzer and the sequence  
345 was compared to related sequences in a database using phylogenetic analysis.  
346 CE conditions for FINS were those recommended by the genetic analyzer  
347 manufacturer which for most cases was Applied Biosystems. To this end, seven  
348 species of the genus *Lophius* or anglerfish were successfully identified by FINS  
349 [37]. Also, a method for the authentication of scombroid products, from fresh fish  
350 to canned products was developed by means of FINS. This technique was used  
351 as a routine method for the detection of mislabeling in the marketing of  
352 scombroid species and was also suitable for the assessment of seafood  
353 traceability of these products [38]. In this sense, FINS was tested on all kinds of  
354 processed products, including those undergoing intensive processes of  
355 transformation such as salmon, trout and bream [38] or hake species [39].

356 While sequencing techniques were considered the most direct way for  
357 obtaining a large amount of information, they suffer from a limited number of  
358 reference sequences for comparisons. Two decades after the development of  
359 FINS, improved technology such as barcoding resulted in faster and more  
360 affordable sequencing capabilities. The major goal of barcoding was to provide  
361 molecular identification of organisms using a standardized short highly variable  
362 DNA region (barcode) and to create a special database that would be more  
363 taxonomically accurate [32, 35]. Recently, DNA barcoding gained support as a  
364 rapid, cost-effective and broadly applicable molecular diagnostic technique and  
365 was tested against real market samples in North American seafood. The  
366 database generated was able to provide matches of > 97% sequence similarity  
367 and to show 25% of the samples as potentially mislabeled [41]. Similarly, a DNA  
368 barcoding approach used for identifying species substitutions cases in shark  
369 species allowed the recognition of commercial frauds in the trade of “palombo”  
370 (that is referred to the triakiids *Mustelus mustelus* and *Mustelus asterias* for the  
371 Italian regulation) [42].

372 Finally, other DNA-technologies such as microfluidic-based lab-on-a-chip  
373 from the Agilent 2100 Bioanalyser that incorporated conventional CE was used  
374 for fish species identification by simplifying an existing PCR-RFLP approach  
375 [45]. The Labchips used by the system were small (3 cm<sup>2</sup>), disposable, single-  
376 use units containing etched capillaries attached directly to sample loading wells.

377 DNA fragments were separated by CE and detected using laser-induced  
378 fluorescence by the Bioanalyzer. The use of this system allowed the  
379 simultaneous post-digest analysis of 12 samples in less than 40 min, which was  
380 a considerable time reduction compared to conventional gel-based methods.  
381 Using DNA admixtures, the discrimination of 5% salmon DNA in trout DNA was  
382 readily achieved. [45]. Moreover, the identification of ten species of white fishes,  
383 was achieved using PCR-RFLP of the mitochondrial cyt b gene. End-point  
384 analysis enabled accurate sizing of DNA fragments and identification of fish  
385 species at a level of 5% (w/w) in a fish admixture [46].

386

### 387 **3.- Concluding remarks and future outlook**

388 Although DNA-based methods for traceability and authentication of foods from  
389 animal origin have been constantly explored and there were many reports of  
390 their applications on meat and meat products and fish and seafood products,  
391 there were not as many developments using capillary electrophoresis, except for  
392 those using CE-based genetic analyzers and microchips. Since traceability and  
393 most authentication issues related to foods of animal origin are complex and  
394 there is an increasing demand for testing, mainly for food safety reasons, it is  
395 anticipated that more and more lab-on-a-chip platforms and the use of capillary  
396 array electrophoresis-based genetic analyzers may gain popularity.

397

398 **4.- Acknowledgements**

399 The technical assistance of Maria del Carmen Estrada Montoya and Alfonso  
400 Aguilar Valenzuela were gratefully acknowledge.

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418



419 **5.- References**

420 [1] Turci, M.L.S. Sardaro, G. Visioli, E. Maestri, M. Marmiroli, N. Marmiroli, Food  
421 Control, 21 (2010) 143.

422 [2] A. Furness, K.A. Osman, in: M. Lees (Ed.), Food Authenticity and  
423 Traceability, CRC Press, Boca Raton, FL, 2003, pp. 473-479.

424 [3] G. Le Gall, I.J. Colquhoun, in: M. Lees (Ed.), Food Authenticity and  
425 Traceability, CRC Press, Boca Raton, FL, 2003, pp. 131-155.

426 [4] F. Schwägele, Meat Sci., 71 (2005) 164.

427 [5] L.M. Reid, C.P. O'Donnell, G. Downey, Trends Food Sci. Tech., 17 (2006)  
428 344.

429 [6] A. Pirondini, U. Bonas, E. Maestri, G. Visioli, M. Marmiroli, N. Marmiroli, Food  
430 Control, 21 (2010) 663.

431 [7] I. Mafra, I. Ferreira, M. Oliveira, Eur. Food Res. Technol., 227 (2008) 649.

432 [8] V. García-Cañas, R. González, A. Cifuentes, Trac-Trend Anal. Chem., 23  
433 (2004) 637.

434 [9] F. Kvasnicka, J. Sep. Sci., 28 (2005) 813.

435 [10] V. García-Cañas and A. Cifuentes, Electrophoresis 28 (2007) 4013.

436 [11] V. García-Cañas, A. Cifuentes, Electrophoresis, 29 (2008) 294.

437 [12] M. Herrero, V. García-Cañas, C. Simo, A. Cifuentes, Electrophoresis, 31  
438 (2010) 205.

- 439 [13] B. Vallejo-Cordoba, M.G. Vargas Martínez, in: J.P. Landers, (Ed.)  
440 Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated  
441 Microtechniques, CRC Press, Boca Raton, FL, 2008, pp 853-912.
- 442 [14] A. D. Pinto, V. Forte, M. C. Guastadisegni, C. Martino, F. P. Schena and G.  
443 Tantillo, *Food Control* 18 (2007) 76.
- 444 [15] T. Demeke, G. Jenkins, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2009) 1977.
- 445 [16] A. Escarpa, M.C. González, M.A.L. Gil, A.G. Crevillén, M. Hervás, M.  
446 García, *Electrophoresis*, 29 (2008) 4852.
- 447 [17] B. Vallejo-Cordoba, A.F. González-Córdova, M.A. Mazorra-Manzano, R.  
448 Rodríguez-Ramírez, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 826.
- 449 [18] O. Aslan, R.M. Hamill, T. Sweeney, W. Reardon, A.M. Mullen, *J. Anim. Sci.*,  
450 87 (2009) 57.
- 451 [19] M. Prado, P. Calo-Mata, T.G. Villa, A. Cepeda, J. Barros-Velázquez, *Food*  
452 *Chemistry*, 105 (2007) 436.
- 453 [20] Q. Wang, X. Zhang, H.-Y. Zhang, J. Zhang, G.-Q. Chen, D.-H. Zhao, H.-P.  
454 Ma, W.-J. Liao, *Meat Sci.* 85 (2010) 265.
- 455 [21] V. Fajardo, I. González, J. Dooley, S. Garret, H.M. Brown, T. García, R.  
456 Martín, *J. Sci. Food Agr.*, 89 (2009) 843.
- 457 [22] F. La Neve, T. Civera, N. Mucci, M.T. Bottero, *Meat Sci.* 80 (2008) 216.
- 458 [23] K.-M. Pun, C. Albrecht, V. Castella, L. Fumagalli, *Electrophoresis*, 30 (2009)  
459 1008.

- 460 [24] S. Sasazaki, H. Mutoh, K. Tsurifune, H. Mannen, *Meat Sci.* 77 (2007) 161.
- 461 [25] G.H. Shackell, H.C. Mathias, V.M. Cave, K.G. Dodds, *Meat Sci.* 70 (2005)  
462 337.
- 463 [26] L. Orrú, F. Napolitano, G. Catillo, B. Moioli, *Meat Sci.* 72 (2006) 312.
- 464 [27] C. Dalvit, M. De Marchi, R. Dal Zotto, M. Gervaso, T. Meuwissen, M.  
465 Cassandro, *Meat Sci.* 80 (2008) 389.
- 466 [28] C. Dalvit, M. De Marchi, C. Targhetta, M. Gervaso, M. Cassandro, *Food*  
467 *Res. Int.*, 41 (2008) 301.
- 468 [29] E. Alves, A.I. Fernández, A. Fernández-Rodríguez, D. Pérez-Montarelo, R.  
469 Benitez, C. Ovilo, C. Rodríguez, L. Silió, *Animal*, 3 (2009) 1216.
- 470 [30] J.M. Butler, E. Buel, F. Crivellente, B.R. McCord, *Electrophoresis*, 25 (2004)  
471 1397.
- 472 [31] R. Ogden, *Fish Fish.*, 9 (2008) 462.
- 473 [32] R.S. Rasmussen, M.T. Morrissey, *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 7 (2008) 280.
- 474 [33] R.S. Rasmussen, M.T. Morrissey, *Compr. Rev. Food Sci. F.*, 8 (2009) 154.
- 475 [34] L. Asensio Gil, *Trends Food Sci. Tech.*, 18 (2007) 558.
- 476 [35] F. Teletchea, *Revi. Fish Biol. Fisher.*, 19 (2009) 265.
- 477 [36] M.T. Bottero, A. Dalmaso, M. Cappelletti, C. Secchi, T. Civera, J.  
478 *Biotechnol.*, 129 (2007) 575.
- 479 [37] M. Espiñeira, N. González-Lavín, J.M. Vieites, F.J. Santaclara, *J. Agr. Food*  
480 *Chem.*, 56 (2008) 10594.

481 [38] M. Espiñeira, N. Gonzalez-Lavín, J.M. Vieites, F.J. Santaclara, Food  
482 Chem., 117 (2009) 698.

483 [39] M. Espiñeira, J. Vieites, F. Santaclara, Eur. Food Res. Technol., 229 (2009)  
484 785.

485 [40] M. Pelarez, P. Presa, J. Agr. Food Chem., 56 (2008) 10865.

486 [41] E.H.K. Wong, R.H. Hanner, Food Res. Int., 41 (2008) 828.

487 [42] M. Barbuto, A. Galimberti, E. Ferri, M. Labra, R. Malandra, P. Galli, M.  
488 Casiraghi, Food Res. Int., 43 (2010) 376.

489 [43] F.J. Santaclara, M. Espiñeira, A.G. Cabado, A. Aldasoro, N. Gonzalez-  
490 Lavin, J.M. Vieites, J. Agr. Food Chem., 54 (2006) 8461.

491 [44] M. Espiñeira, N. Gonzalez-Lavin, J.M. Vieites, F.J. Santaclara, J. Agr. Food  
492 Chem., 57 (2009) 495.

493 [45] J.J. Dooley, H.D. Sage, H.M. Brown, S.D. Garrett, Food Control, 16 (2005)  
494 601.

495 [46] J.J. Dooley, H.D. Sage, M.-A.L. Clarke, H.M. Brown, S.D. Garrett, J. Agr.  
496 Food Chem., 53 (2005) 3348.

497

498

499

500

501

502 **Figure Captions**

503

504 Figure 1.- Species-specific patterns observed in nine meat samples using a  
505 minisequencing reaction and capillary electrophoresis: A) red deer, B) steinbock,  
506 C) chamois, D) goat, E) roe deer, F) sheep, G) cattle, H) swine and I) buffalo.  
507 Redrawn from [22].

508

509 Figure 2.- Species-specific patterns observed in five raw tuna samples using a  
510 multiplex primer-extension (PER) assay and capillary electrophoresis: A)  
511 *Tunnus alalunga*, B) *Tunnus albacores*, C) *Tunnus obesus*, D) *Katsuwonus*  
512 *pelamis* and E) *Tunnus thynnus*. Redrawn from [35].

513

514

515

516

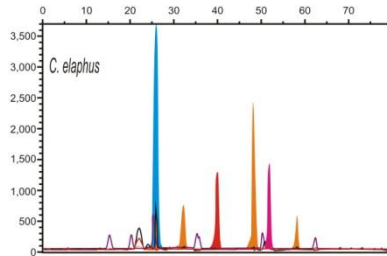
517

518

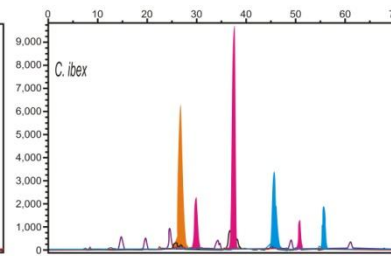
519

520

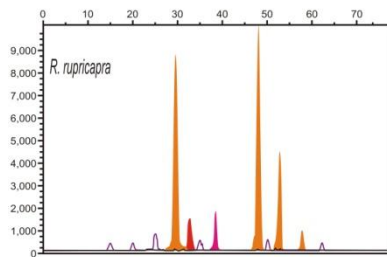
521



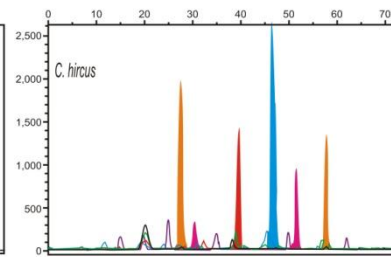
522



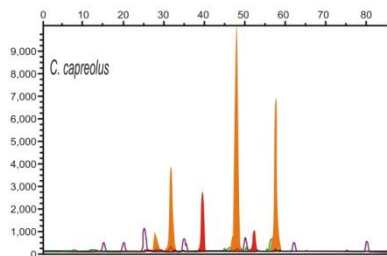
523



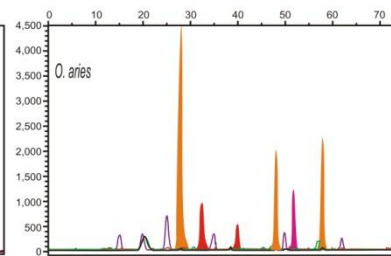
524



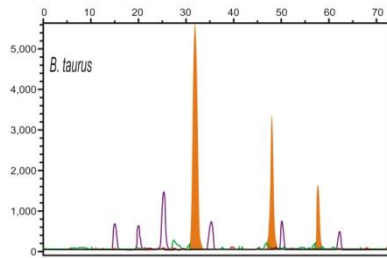
525



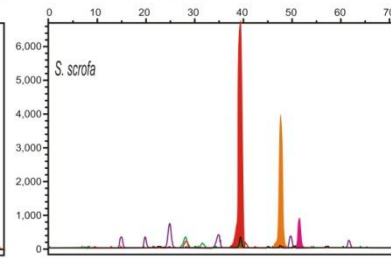
526



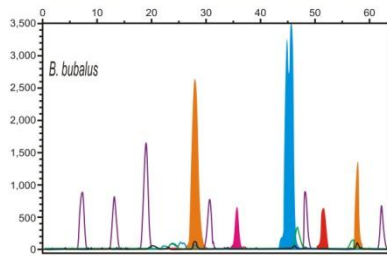
527

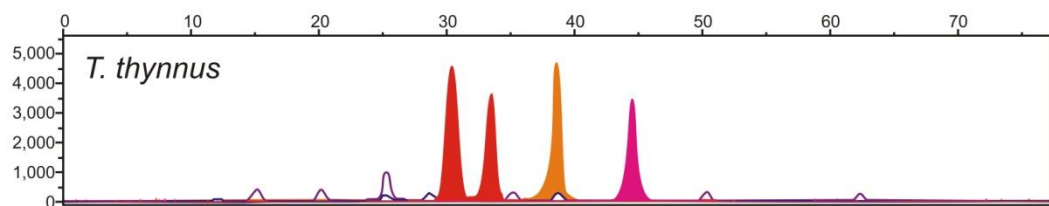
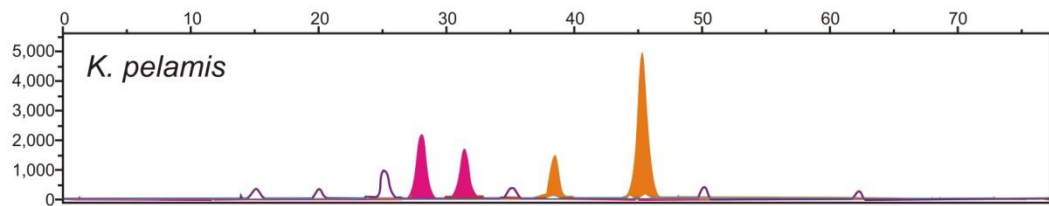
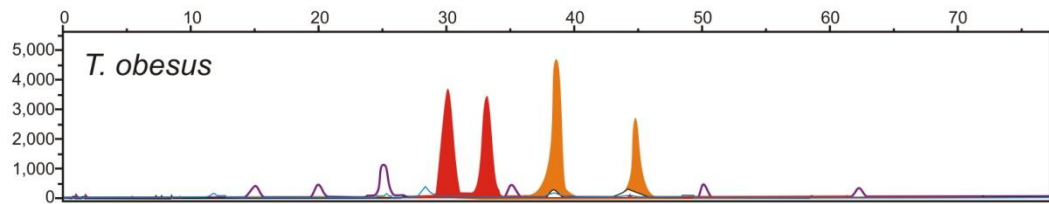
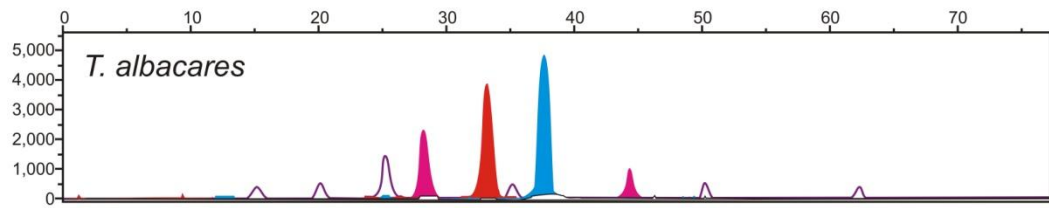
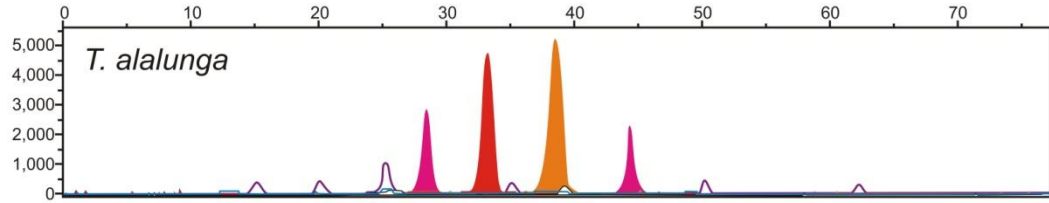


528



529





530

531

532

533

534

# Capítulo 3

## **TRAZABILIDAD DE LA CARNE DE BOVINO: CONCEPTOS, ASPECTOS TECNOLÓGICOS Y PERSPECTIVAS PARA MÉXICO**

Artículo publicado en la revista INTERCIENCIA OCT 2010, VOL. 35 Nº 10



---

# TRAZABILIDAD DE LA CARNE DE BOVINO: CONCEPTOS, ASPECTOS TECNOLÓGICOS Y PERSPECTIVAS PARA MÉXICO

ROBERTO RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, AARÓN F. GONZÁLEZ-CÓRDOVA, ANA  
ARANA, ARMIDA SÁNCHEZ-ESCALANTE y BELINDA VALLEJO-CORDOBA

---

## RESUMEN

*La trazabilidad de la carne de bovino es de gran importancia para la seguridad alimentaria, ya que garantiza su identidad y rastreabilidad desde el origen hasta la comercialización. La trazabilidad comienza con la identificación de los animales; sin embargo, los marcadores clásicos, aunque necesarios, son removidos durante el sacrificio. Por otro lado, los métodos que utilizan marcadores moleculares, basados en el perfil del ADN, son permanentes y únicos. Por ello, en un sistema de trazabilidad para la carne es conveniente que ambos métodos se complementen para asegurar el seguimiento del producto en toda la cadena productiva. En esta revisión se plantea un panorama general de conceptos y aspectos tecnológicos de la trazabilidad de la carne de bovino, se describen los principales métodos utilizados para la trazabilidad, incluyendo la selección y evaluación de marcadores moleculares, y se presentan las perspectivas de la trazabilidad en diferentes países, enfatizando el caso de México.*

---

Las distintas crisis relacionadas con alimentos ocurridas en las últimas dos décadas han despertado una preocupación generalizada en las condiciones de producción y comercialización de los alimentos. En el caso particular de la carne (Pettitt, 2001; Felmer *et al.*, 2006), la posible vinculación de enfermedades fatales en el hombre como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), también conocida como “mal de las vacas locas”, la encefalopatía espongiiforme ovina (*scrapie* por sus siglas en inglés), la fiebre aftosa (bovinos, porcinos, caprinos y ovinos), la peste porcina clásica

(PPC), y en fechas recientes la influenza porcina, han generado la mayor crisis de desconfianza registrada en la historia de la industria cárnica. Aunado a esto, dichas crisis podrían ser intensificadas debido a la presencia de residuos de sustancias peligrosas en los productos cárnicos, tales como hormonas y agentes anabolizantes (Estrada-Montoya *et al.*, 2008), antibióticos (Sofos, 2008) y pesticidas (Sallam y Ali Morshedy, 2008), entre otros. Debido a la facilidad con la que estos problemas se han diseminado entre países, y a la complejidad para establecer sistemas de control y/o prevención (Pettitt, 2001; Felmer *et al.*, 2006), se ha

generado una gran alarma en los consumidores que esperan obtener productos de calidad e inoocuos para la salud.

De las experiencias adquiridas a partir de los brotes de EEB en la Unión Europea (UE) y en los EEUU en 1986 y 2003, respectivamente; así como de la detección de *E. coli* cepa O157:H7 entero-hemorrágica en carne molida en los EEUU en 1982 (Sofos, 2008), solo por citar algunos ejemplos, se evidenció la imperiosa necesidad de establecer procedimientos de identificación y seguimiento individual de los animales destinados al consumo humano, para así rastrear este tipo de

---

**PALABRAS CLAVE / ADN / Huella Genética / Identificación Animal / Marcadores Moleculares / Trazabilidad /**

---

Recibido: 21/01/2010. Modificado: 18/09/2010. Aceptado: 20/09/2010.

**Roberto Rodríguez Ramírez.** Químico Biólogo en Tecnología de Alimentos, Universidad de Sonora, México. Maestro en Ciencia y Candidato a Doctor en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), México.

**Aarón Fernando González-Córdova.** Ingeniero Bioquímico en Alimentos, Instituto Tecnológico de Monterrey, México. Candidato a Doctor en Ciencias en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, México. Profesor Investigador, CIAD, México.

**María Arana Navarro.** Doctora en Genética y Mejora Animal, Universidad de Zaragoza, España. Catedrática, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, España.

**Armida Sánchez-Escalante.** Química Bióloga en Tecnología de Alimentos, Universidad de Sonora, México. Doctora en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Zaragoza, España. Maestra en Ciencias, CIAD, México. Profesora Investigadora, CIAD, México.

**Belinda Vallejo-Cordoba.** Química, Universidad Iberoamericana, México. Doctora en Ciencia de los Alimentos, University of British Columbia, Canadá. Profesora Investigadora, CIAD, México. Dirección: Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos, CIAD. Carretera a La Victoria Km. 0.6; Apartado 1735, Hermosillo, Sonora, 83000, México. e mail: vallejo@ciad.mx

---

incidentes en la cadena de producción de alimentos. Para ello, las autoridades gubernamentales requieren de sistemas eficientes que les permitan identificar rápidamente y de forma confiable el origen de los alimentos implicados o sospechosos.

Estos procedimientos deben ser realizados mediante la aplicación de nuevas tecnologías adaptadas para dar respuestas en tiempos cortos, acordes a la modernización y globalización de los intercambios comerciales actuales. Lo anterior ha traído como consecuencia que hoy en día el término “trazabilidad” sea parte del lenguaje común en la cadena de producción, industrialización y comercialización de los alimentos (Felmer *et al.*, 2006).

Aunado a lo anterior, actualmente los consumidores están prestando mayor atención a los aspectos de inocuidad al momento de seleccionar o adquirir sus alimentos. De aquí que poder conocer la procedencia u origen de estos, sea relevante. Asimismo, la trazabilidad es indispensable para la comercialización de alimentos con valor añadido, como los que ostentan denominación de origen, identificación geográfica de procedencia o marcas de calidad diferenciada (Arana *et al.*, 2002; Dalvit *et al.*, 2007).

### **Trazabilidad alimentaria**

De acuerdo con la UE (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, animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia, destinada a ser incorporada en alimentos o piensos, o con probabilidad de serlo.

De forma general, la trazabilidad es un conjunto de acciones, medidas y procedimientos técnicos que permiten identificar y registrar cada alimento, desde su origen hasta el final de la cadena de comercialización. Así la trazabilidad facultará rastrear la cadena de producción y otorga a los productores la posibilidad de colocar sus productos en mercados más rentables, que exigen la certeza del origen y de las distintas etapas del proceso productivo (Felmer *et al.*, 2006; Yordanov y Angelova, 2006). Todo esto indica que las empresas deben disponer de un sistema de gestión de calidad documentada que permita identificar y realizar un seguimiento de los productos que entran, permanecen y salen de la empresa, de una manera ágil, rápida y eficaz, con la finalidad de que ante una crisis, puedan tomarse las medidas necesarias; para dar respuesta, la empresa alimentaria dispone de una herramienta que es su sistema de trazabilidad.

### **Importancia de los sistemas de trazabilidad**

Un buen sistema de trazabilidad no solo es importante para la seguridad alimentaria y para la protección de la salud de los consumidores, sino que adicionalmente aporta beneficios a la industria procesadora que lo aplica. Es decir, sirve como un instrumento para lograr un elevado grado de protección de la vida y la salud de los consumidores y facilita, dentro de la empresa, el control de procesos y los sistemas de gestión de calidad. Finalmente, brinda una oportunidad comercial para la diferenciación de productos por calidad asociada a marcas y/o denominaciones de origen (valor añadido) frente a los competidores (Arana *et al.*, 2002; Dalvit *et al.*, 2007).

### **Orígenes de la trazabilidad**

En la década de los noventa, la trazabilidad surgió por primera vez en la Unión Europea con el objetivo principal de otorgar certeza y seguridad a los consumidores ante los problemas causados, fundamentalmente, por la aparición de la EEB. Si bien la trazabilidad como un nuevo concepto de seguridad, surgió con mayor fuerza a partir de esta crisis, ya existían desde 1994, en el Reino Unido, sistemas de aseguramiento de calidad cuyo objetivo era el de certificar que la carne producida en dicho país, se obtuviera bajo condiciones seguras, resguardando el bienestar animal y la protección del medio ambiente (Schwägle, 2005).

En los EEUU, la trazabilidad surgió ante la necesidad de promocionar el consumo de carnes rojas, que había perdido terreno en los últimos años ante las crisis presentadas, y esto se hizo mediante la certificación de procesos de producción (Smith *et al.*, 2005). En México, el interés se ha centrado en proteger la credibilidad hasta ahora ganada, frente a los compradores externos de carne de bovino.

### **Normatividad y legislación de la trazabilidad para bovinos en la UE**

Para lograr incrementar la transparencia de las condiciones de producción y comercialización de la carne de bovino en la UE fue necesario aplicar y cumplir irrestrictamente las normas en materia de identificación de animales destinados al consumo humano. La revisión de las directivas de la UE realizada en 1997 estableció que cada uno de los países miembros de la Unión debería identificar individualmente a los animales por medio de aretes, así como llevar registros de las exportaciones, por medio del uso de pasaportes individuales

(European Commission, 1997). A partir de esta fecha también se estableció que los países miembros desarrollarían bases de datos con la información individualizada de los animales cuyo destino final fuera el consumo. Además, se adoptaron nuevas disposiciones relativas a la obligatoriedad de etiquetar y rastrear la carne (Reglamento EC/1760/2000) a lo largo de toda su cadena de distribución. Estas acciones tuvieron como objetivo primordial, recuperar la confianza de los consumidores por el consumo de carne y sus derivados (European Commission, 2000).

En el 2000, el llamado “Libro Blanco” sobre la seguridad alimentaria de la Comisión Europea fue revisado. Derivado de esta revisión se concretaron los principios que regirían a la legislación alimentaria de la UE, para lograr elevados niveles de seguridad y la protección que los consumidores requerían (EC/178/2002; European Commission, 2002). El Libro Blanco propuso un enfoque integral abarcando, “desde la granja hasta el consumidor”, considerando que la seguridad de los alimentos comienza por los animales y los alimentos que estos consumen. También se consideró la necesidad de establecer sistemas de trazabilidad que incluyeran la identificación de animales como uno de los requisitos principales (Felmer *et al.*, 2006; Dalvit *et al.*, 2007).

En el Reglamento 1760/2000 de la UE (European Commission, 2000) se estableció un sistema para la identificación y registro de los bovinos, y para el etiquetado de la carne de éstos y sus productos derivados. En este sistema se exigió que todo el ganado bovino y carnes frescas o congeladas derivadas fueran etiquetados con un código de referencia que vinculara la carne con los animales de origen, el país de sacrificio y de procesamiento (sacrificio y/o despiece), así como los números de aprobación de los rastros y plantas de procesamiento (Felmer *et al.*, 2006; Dalvit *et al.*, 2007). El artículo 3 del EC/1760/2000 establece que un sistema de identificación y registro de bovinos debe contar con los siguientes elementos: a) aretes o crotales para identificar a los animales individualmente; b) una base de datos computarizada; c) pasaportes para los animales; y d) registros individuales de cada operación (European Commission, 2000).

En enero de 2002 se publicó el reglamento 178/2002, mediante el cual la UE estableció los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, y dio lugar a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Commission, 2002). En ese mismo año entró en vigencia la segunda fase de esta normativa, la cual exigía que el etiquetado proporcionara información del país de nacimiento

del animal y de los lugares por los que este hubiera transitado. Además, se exigieron registros actualizados de: vacunas, alimentación y enfermedades, entre otros.

Aunque originalmente la legislación europea se enfocó solo al ganado bovino, actualmente se está prestando atención a otro tipo de animales de consumo como ovejas y cabras, así como a otros sistemas alimentarios a los que es necesario dar seguimiento bajo un esquema de trazabilidad alimentaria (European Commission, 2002). Cabe señalar que a partir de enero del 2005 y de acuerdo a la legislación contenida en el Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria, la trazabilidad es de observancia obligatoria para la Unión Europea (Schwägele, 2005; Dalvit *et al.*, 2007).

### **La trazabilidad de la carne de bovino en un contexto internacional**

La mayoría de países que exportan ganado bovino han adoptado un sistema de trazabilidad en respuesta, sobre todo, a las exigentes normas impuestas por la UE y Japón (Dalvit *et al.*, 2007) para la importación de cortes de res. Así, la cadena bovinos-carne ha sido el principal eje de las acciones de trazabilidad propiciadas por el intercambio comercial entre diferentes países (Smith *et al.*, 2005). De esta manera, no solamente la UE ha establecido sistemas de trazabilidad para sus alimentos, sino que también otros países han implementado sistemas de trazabilidad empezando con la identificación de animales destinados al consumo.

Australia inició trabajos en trazabilidad en 1999, con un sistema de cumplimiento voluntario que incluyó el uso de aretes para la identificación de ganado, etiquetas con códigos de barras para los animales sacrificados, así como la recolección de muestras de sangre de estos animales para obtener su huella genética a partir del ADN. Los resultados del análisis de las huellas de ADN fueron pieza fundamental para establecer la capacidad de rastreo e identificación de los animales destinados al consumo, con el enfoque global “de la granja a la mesa” (Smith y Saunders, 2005). Actualmente, la trazabilidad para bovinos desde el nacimiento hasta el sacrificio, es de carácter obligatorio en Australia.

En Canadá se establecieron sistemas de trazabilidad basados en la identificación de los animales por medio de registros electrónicos y manuales. Hoy en día la trazabilidad solo es obligatoria para la provincia de Quebec. Para países como Uruguay, Brasil, Argentina, Chile y México, donde el mercado de exportación de carne de bovino es importante, la trazabilidad es obligatoria hasta el sacrificio de

los animales, mientras que para los EEUU, la trazabilidad es de carácter voluntario (Smith *et al.*, 2005).

Por otro lado, en países del continente asiático como Japón y Corea, los sistemas de trazabilidad para la carne de bovino son muy estrictos, e incluyen el análisis del ADN para corroborar el rastreo del producto. En Japón se utiliza la identificación genética con muestras de ADN para confirmar la información de las bases de datos. En Corea enfatizan la “transparencia de la trazabilidad” también usando pruebas basadas en el ADN y con la instalación de kioscos electrónicos en los supermercados, que permiten a los consumidores utilizar computadoras en las cuales pueden ingresar el código de barras del paquete del corte de carne, para conocer toda la información relacionada con el programa de trazabilidad (Smith y Saunders, 2005).

### **Importancia de establecer sistemas de trazabilidad en México**

El sector bovinos-carne de México genera anualmente alrededor de  $1,5 \times 10^6$  ton de carne, con las que se abastece el mercado interno y se cumple con los compromisos de exportación. A nivel nacional, los cinco principales estados productores de carne de bovino (58,7% del total de la producción) son Veracruz, Jalisco, Chiapas, Sonora y Chihuahua (Luna Martínez y Albarrán Díaz, 2006). De éstos, el estado de Sonora se distingue por la calidad de sus cortes de carne, calidad que es inspeccionada y avalada por la Comisión Estatal de la Carne (CEC), organismo del gobierno del estado.

Por otro lado, al estar México inmerso en un mercado globalizado, no está excluido de las nuevas tendencias internacionales, ni de las preferencias de los consumidores e incluso de las alternativas de producción que tendrán que ir desarrollándose en mayor volumen. Ejemplos de estos son la producción con trazabilidad o rastreabilidad, que den certeza de calidad e información al consumidor (Luna Martínez y Albarrán Díaz, 2006).

Desde el año 2004, las exportaciones de carne mexicana a Japón se incrementaron en ~300% (SAGARPA, 2006a), debido a que ese año, como hasta hoy, la carne de México está libre de fiebre aftosa y de encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), enfermedades que han afectado a los hatos ganaderos de otros países (SAGARPA, 2006b). La carne mexicana ha alcanzado un posicionamiento importante en los países asiáticos, gracias a su calidad e inocuidad. Sin embargo, no hay que perder de vista que dichos países verifican la trazabilidad genética de la carne por medio del análisis del ADN, por lo que la carne

proveniente de otros países, entre ellos la de México, podría ser sometida, en el corto plazo, al mismo requerimiento.

Ante este escenario de apertura comercial globalizado, en el 2003, el gobierno de México inició el Sistema Nacional de Identificación Individual de Ganado (SINIIGA), el cual establece que la identificación del ganado se realizará mediante la colocación de aretes que deberán permitir una identificación única y permanente del animal a lo largo de toda su vida ([www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)). El objetivo del SINIIGA fue establecer la identificación individual y permanente del ganado en México y conformar una base de datos que permitiera tomar acciones integrales para elevar los estándares sanitarios y de competitividad de la ganadería mexicana. El SINIIGA consta de dos componentes: el componente físico que incluye la identificación individual del animal por medio de la colocación de dos aretes y el componente de información que consiste en diseñar e implementar un sistema (base de datos nacional y regional), para operar el SINIIGA. En este sistema quedan registrados los datos del productor, de la unidad de producción pecuaria (UPP) y del animal; así como las notificaciones del nacimiento, importación, ingreso o salida de un animal a una UPP por cualquier causa, además del sacrificio del animal en el rastro ([www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)).

Aunque México cuenta con el SINIIGA, durante el sacrificio del animal y su posterior despiece, la capacidad de rastreo se pierde, por lo que es necesario que además se implemente un sistema de trazabilidad que verifique la identidad del animal y de los productos hasta llegar al consumidor. En particular, un sistema de trazabilidad verificable con la huella genética podría ser una buena alternativa para empresas mexicanas exportadoras de carne que cuentan con un esquema de comercialización integrado. La trazabilidad respaldada por el código basado en el ADN o huella genética para identificar al animal y sus productos, permitiría la trazabilidad con una mayor exactitud (Smith y Saunders, 2005).

### **Tecnologías para trazabilidad e identificación de ganado**

Uno de los principales requisitos en la trazabilidad de bovinos es la implementación de un sistema que permita su identificación. Si bien existe una gran variedad de métodos para la identificación de animales y sus derivados, en términos generales estos métodos se han clasificado en: no biométricos o clásicos, y biométricos. Entre los métodos no biométricos se encuentran los tatuajes, crotales o aretes, y los dispositivos electrónicos (Felmer *et al.*, 2006).

Entre los marcadores biométricos se encuentran la huella nasal, las imágenes digitales de iris/retina y el análisis de ADN, conocido como huella genética (DNA fingerprinting). Estos métodos se han considerado como una solución no invasiva para la identificación individual de animales (Felmer *et al.*, 2006). El principio de la identificación animal a través de la huella genética del ADN se basa en que, a excepción de los gemelos monocigotos y de los clones, todos los individuos de una población animal difieren entre sí a nivel de su ADN. De esta manera es posible utilizar marcadores genéticos moleculares, para establecer dichas diferencias o polimorfismos (Cunningham y Meghen, 2001; Schwägele, 2005).

### Trazabilidad de la carne de bovino

La trazabilidad de la carne consiste en darle seguimiento durante toda la cadena productiva, es decir, desde el nacimiento del animal en la granja, hasta su venta al detalle en los puntos de venta (Pettitt, 2001; Dalvit *et al.*, 2007). En todo este proceso se debe asegurar la identidad y calidad del producto. Así, ante cualquier problema o conflicto de identidad, debe ser posible rastrear el origen. Algunos de los métodos de trazabilidad clásicos, como aretes o crotales, y algunos otros, no son suficientes debido a que pueden ser removidos o alterados durante el sacrificio y despiece de los animales. Para evitar este inconveniente, en varios países se están desarrollando métodos de respaldo que puedan asegurar totalmente la trazabilidad (Smith y Saunders, 2005). Uno de estos métodos de respaldo es la denominada trazabilidad genética o molecular, la cual se basa específicamente en el estudio de marcadores moleculares del ADN (Stanford *et al.*, 2001; Schwägele, 2005).

### Trazabilidad genética por marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que sirven de referencia para seguir la transmisión de la información genética, de una generación a otra. En el sentido más estricto, un marcador molecular es una entidad genética que manifiesta polimorfismo (variabilidad en la composición de su ADN). El interés por detectar variaciones genéticas para diversas aplicaciones ha conducido al incremento en el tipo y número de marcadores disponibles para el análisis del ADN (Cañon y Dunner, 2003).

Los tipos de marcadores moleculares que se han utilizado son: RAPD (de *random amplification of polymorphic DNA*) o polimorfismos de ADN

amplificados al azar, RFLP (de *restriction fragment length polymorphisms*) o polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, AFLP (de *amplified fragment length polymorphism*) o polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados, STR (de *short tandem repeat*) o microsatélites y SNP (de *single nucleotide polymorphism*) o polimorfismos de un solo nucleótido (Buntjer *et al.*, 2002; Ratón, 2004; Mburu y Hanotte, 2005).

Aunque existen diferentes marcadores moleculares disponibles que podrían hacer posible la trazabilidad de la carne de bovino, la necesidad de conjugar eficacia biológica y económica restringe el tipo de marcadores a solo dos: los STR o microsatélites y los SNP o polimorfismos de un solo nucleótido. Estos últimos presentan un futuro muy promisorio, aunque por ahora los microsatélites han sido los marcadores de elección (Cunningham y Meghen, 2001; Cañon y Dunner, 2003).

Los microsatélites fueron identificados en 1989, al descubrirse que existían zonas del ADN no codificante (que no contiene información para producir una proteína) que contenían repeticiones de: di, tri, o tetranucleótidos (de adenina (A), guanina (G), citocina (C), timina (T) componentes del ADN) en un número variable de veces (entre 10 y 20 en promedio). Debido a esto, los microsatélites se llamaron inicialmente VNTR (de *variable number of tandem repeats*), porque la unidad repetible está presente un número variable de veces. Sin embargo, el término VNTR también incluía los minisatélites cuya unidad de repetición es más larga (de 100 a varios cientos de nucleótidos). La nomenclatura terminó dejando el término microsatélites o STR para los más cortos, y minisatélites o VNTR para el resto. (Cunningham y Meghen, 2001; Cañon y Dunner, 2003; Mburu y Hanotte, 2005).

En la actualidad, los microsatélites son considerados como la herramienta más poderosa de discriminación genética entre animales, por lo que la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG, por sus siglas en inglés) ha recopilado y recomendado a aquellos microsatélites que proporcionan la mayor información y que sirven como marcadores estándares para la comparación entre distintas razas bovinas (Orri *et al.*, 2006; Sifuentes Rincón *et al.*, 2006; Riojas *et al.*, 2006).

La técnica para discriminar entre animales se basa en la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de *polymerase chain reaction*) de las regiones que contiene las secuencias repetidas de interés. Así, el polimorfismo o las diferencias del ADN son observadas por medio del tamaño de los productos que fue-

ron obtenidos por PCR después de su separación en geles o en sistemas automatizados, como es el caso de los secuenciadores para ADN (Mburu y Hanotte, 2005).

Por otra parte, los SNP son producidos por un cambio único de los nucleótidos que componen el ADN (A, G, C, T) en un individuo. Aunque proveen menos información que los microsatélites, los SNP tienen la ventaja de presentar menos mutaciones o cambios, ya que son genéticamente estables y muy fácilmente adaptables para el análisis automatizado con secuenciadores (Cañon y Dunner, 2003). Otra ventaja es que facilitan y agilizan su detección con el uso de nuevas tecnologías para el análisis del ADN (microarreglos o microchips) que permiten una gran cantidad de reacciones diarias, con costos relativamente bajos (Cunningham y Meghen, 2001; Mburu y Hanotte, 2005; Yordanov y Angelova, 2006).

### Sistema de trazabilidad integral para carne de bovino

En la práctica, un sistema de trazabilidad integral funciona de la siguiente forma: cada vez que un animal es sacrificado, se colecta una muestra biológica del animal antes de que se pierda la identidad del mismo (por ejemplo, antes de la pérdida de los crotales) y se guarda con la identificación completa como muestra de referencia. Las muestras de referencia pueden ser sangre, semen, carne/tejido o pelo. Esta muestra se almacena por un período no inferior a la "vida útil" del producto, y después de este período la muestra puede ser descartada. Posteriormente, en el caso de que sea necesario establecer el origen del producto en cualquier punto de la cadena, se toma la muestra (problema) para obtener la huella genética del ADN, y este perfil se compara con la muestra o muestras de referencia, para determinar si ambas huellas genéticas son idénticas o no. Si las huellas son diferentes, esto significa que la muestra problema analizada no proviene del animal con el que fue comparado (Cunningham y Meghen, 2001). De hecho de esta manera se puede comprobar si una muestra de carne que viene de un supuesto animal es en realidad de este y no de un sustituto, comparándola con la muestra de referencia" favor de cambiar por "De tal manera que se puede comprobar si una muestra de carne que viene de un supuesto animal es en realidad de este y no de un sustituto, cuando se comprara con la muestra de referencia. De cualquier manera, el sistema requiere de trazabilidad documentada, es decir, conocer al menos los posibles lotes o procesadores y las fechas para las muestras de referencia y las muestras problema. En algunos casos, el etiquetado po-

dría indicar de qué animal proviene la muestra de carne, por lo que solo se compararía con las muestras de referencia correspondientes.

En general, hay tres posibilidades cuando se hace una prueba de identificación (probabilidad de correspondencia) para la carne: i) que la huella genética de la muestra problema no resulte igual a las huellas genéticas de las muestras de referencia, ii) que la huella genética de la muestra problema corresponda a una de las huellas genéticas de las muestras de referencia o iii) que la huella genética de la muestra problema corresponda a la huella genética de más de una de las muestras de referencia. Si la muestra problema solo es igual a una muestra de referencia, se puede decir que es del mismo individuo; sin embargo, si es igual a más de una muestra de referencia, esto significa que es necesario seleccionar nuevos marcadores moleculares con mejor poder de discriminación (Shackell y Dodds, 2008). Sin embargo, el grupo de marcadores adecuado dependerá de la raza de los animales y del tamaño de la población (Orru *et al.*, 2006).

Por lo anterior y a fin de simplificar los sistemas de trazabilidad y disminuir los costos de análisis para la trazabilidad genética, se han llevado a cabo diferentes investigaciones basadas en la evaluación y selección de diferentes marcadores moleculares. Orru *et al.* (2006) evaluaron 13 microsatélites, nueve de ellos recomendados por la ISAG, para realizar pruebas de trazabilidad molecular en carne de bovino de cuatro razas italianas de ganado. Los autores implementaron PCR múltiples para disminuir los costos de análisis. Los microsatélites analizados presentaron diferentes grados de polimorfismo entre las diferentes razas, ya que estas presentaron diferentes estructuras genéticas.

Algunos otros estudios de trazabilidad molecular han sido realizados con la finalidad de certificar cortes de carne de acuerdo a su origen o procedencia geográfica. Por ejemplo, el caso de la “ternera de Navarra”, carne fresca procedente de terneros de las razas Pirenaica, Blonde de Aquitania, Parda Alpina, Charolais, y sus cruza, que son nacidos, criados y sacrificados en la región de Navarra, España. Arana *et al.* (2002) evaluaron 10 microsatélites para garantizar que los cortes comercializados bajo esta denominación, realmente correspondieran a las razas permitidas para la denominación “ternera de Navarra”.

Bicalho *et al.* (2006) realizaron un estudio utilizando nueve microsatélites de los recomendados por el ISAG, para evaluar la estimación ancestral de la raza Girolly, entre las razas Gir y Holstein, las cuales derivan de entrecruzamiento entre *Bos Taurus* y *Bos Indicus*. Los autores European Commission (2000) Regulation EC N°

1760/2000 of the European Parliament and pudieron estimar, dentro de un estrecho límite, la proporción ancestral de las razas Holstein y Gir, en individuos de la raza Girolly. Además, sugirieron que estos microsatélites podrían ser utilizados para estimar las proporciones de origen de las razas *B. Taurus* y *B. Indicus* en productos cárnicos comerciales.

Otra aplicación de los microsatélites ha sido su utilización para la trazabilidad en mezclas de carne de diferentes animales o carne molida. Shackell *et al.* (2005) emplearon un método basado en microsatélites para la detección de mezclas de carne en diferentes lotes. Sus hallazgos mostraron que fue posible identificar las proporciones de la carne de cada animal cuando ésta es mezclada tanto en cantidades iguales como en proporciones distintas. Sin embargo, la utilización de este método estuvo limitada a lotes de carne molida proveniente de no más de diez animales.

Dalvit *et al.* (2008) evaluaron la utilización de 12 microsatélites para la trazabilidad en seis razas de ganado bovino de una región de Italia. Así, reportaron que la probabilidad de correspondencia entre dos individuos no emparentados (compartir la misma huella genética) fue de cinco en un millón. Sin embargo, consideraron que utilizar 12 microsatélites elevaba el costo del análisis.

De acuerdo a lo anterior, los métodos para la trazabilidad genética en la identificación de animales en forma individual (obtención de huella genética) utilizan principalmente microsatélites. Los puntos focales de estos métodos de trazabilidad han sido el de tratar de minimizar el número de microsatélites o utilizarlos en conjunto (PCR múltiple) para tratar de reducir el costo por análisis, así como la selección de un buen método de muestreo que sea práctico en la industria cárnica (Arana *et al.*, 2002; Shackell *et al.*, 2005).

En el estudio de Negrini *et al.* (2008) fueron utilizados 90 SNPs para clasificar 24 razas diferentes de ganado europeo. El uso de los SNPs junto con estadística Bayesiana permitió clasificar a los individuos en diferentes grupos conformados por las diferentes razas. Sin embargo, los autores concluyeron que es necesario contar con un grupo suficiente de individuos como referencia, para conformar la información completa. De manera similar, Orru *et al.* (2008) probaron 63 SNPs en seis razas de ganado europeo, de los cuales seleccionaron 18. Con este conjunto de 18 marcadores fue posible corroborar la procedencia de muestras de carne en el comercio, con los animales sacrificados. Sin embargo, la principal limitante para que los SNP sean implementados en los laboratorios de control continua siendo el costo del análisis (Negrini *et al.*, 2008).

## Conclusiones

Un sistema de trazabilidad para carne de bovino debe ser verificable por medio de la trazabilidad molecular. Sin embargo, la trazabilidad molecular debe estar basada en una adecuada selección de marcadores moleculares. Hasta ahora, los microsatélites han sido los marcadores más útiles para la trazabilidad de carne de bovino, y han sido evaluados y seleccionados de acuerdo al tipo de ganado bajo estudio. Como resultado de las crisis alimentarias, en la mayoría de los países se ha implementado algún tipo de sistema de trazabilidad, en algunos solo han consistido en la identificación de animales, mientras que en otros se han implementado sistemas de trazabilidad molecular como un sistema de verificación. Aquellos países que verifican la trazabilidad de la carne por medio de la huella genética tienen la ventaja de poder respaldar su sistema de trazabilidad documental en caso de una alerta alimentaria. En particular México, como exportador de carne hacia mercados muy exigentes, tendría una ventaja competitiva al verificar su sistema de identificación de animales con un sistema de trazabilidad molecular.

## REFERENCIAS

- Arana A, Soret B, Lasa I, Alfonso L (2002) Meat traceability using DNA markers: application to the beef industry. *Meat Sci.* 61: 367-373
- Bicalho HMS, Pimenta CG, Mendes IKP, Pena HB, Queiroz EM, Pena SDJ (2006) Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers. *Genet. Mol. Res.* 5: 432-437
- Buntjer JB, Otsen M, Nijman IJ, Kuiper MTR, Lenstra JA (2001) Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. *Heredity* 88: 46-51
- Cañon J, Dunner S (2003) *Técnicas de genética molecular en laboratorios de producción animal*. VIII Simposium Anual de AVEDILA. León, España. 23-24/10/2003.
- Cunningham EP, Meghen CM (2001) Biological identification systems: genetic markers. *Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.* 20: 491-499.
- Dalvit C, De Marchi M, Cassandro M (2007) Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Sci.* 47: 437-449.
- Dalvit C, De Marchi M, Targhetta C, Gervaso M, Cassandro M (2008) Genetic traceability of meat using microsatellites markers. *Food Res. Int.* 41: 301-307.
- Estrada-Montoya MC, González-Córdova AF, Torrescano G, Camou JP, Vallejo-Cordoba B (2008) Screening and confirmatory determination of Clenbuterol residues in bovine meat marketed in the Northwest of Mexico. *Cien. Tecnol. Alim.* 6: 130-136.
- European Commission (1997) Laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) N° 820/97 as regards eartags, holding registers and passports in the framework of the system for the identification and registration of bovine animals. *Off. J. Eur. Commun.* L354: 19-22.

of

- the Council of 17 July 2000 establishing a system for the identification and registration of bovine animals and regarding the labelling of beef and beef products and repealing Council Regulation (EC) N° 820/97. *Off. J. Eur. Commun. L 204*: 1-10.
- European Commission (2002) Council Regulation (EC) N° 178/2002 of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Off. J. Eur. Commun. L31*: 1-24.
- Felmer R, Chávez R, Catrileo A, Rojas C (2006) Tecnologías actuales y emergentes para la identificación animal y su aplicación en la trazabilidad animal. *Arch. Med. Vet.* 38: 197-206.
- Luna Martínez E, Albarrán Díaz M (2006) *Situación Actual y Perspectiva de la Producción de Carne de Bovino en México*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.gob.mx
- Mburu D, Hanotte O (2005) *A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. A manual prepared for the IAEA/ILRI training course on molecular characterisation of small ruminant genetic resources of Asia*. Oct.-Dec. 2005. ILRI. Nairobi, Kenya.
- Negrini R, Nicoloso L, Crepaldi P, Milanese E, Marino R, Perini D, Pariset L, Dunner S, Leveziel H, Williams JL, Ajmone Marsan P (2008) Traceability of four European Protected Geographic Indication (PGI) beef products using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Bayesian statistics. *Meat Sci.* 8: 1212-1217.
- Orru L, Napolitano F, Catillo G, Moiola B (2006) Meat molecular traceability: How to choose the best set of microsatellites. *Meat Sci.* 72: 312-317.
- Orru L, Catillo G, Napolitano F, De Matteis G, Scata MC, Signorelli F, Moiola B (2008) Characterization of a SNPs panel for meat traceability in six cattle breeds. *Food Control* 20: 856-860
- Pettitt RG (2001) Traceability in the food animal industry and supermarket chains. *Rev. Sci. Tech.* 20: 584-597.
- Ratón TO (2004) Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev. Iberoam. Micol.* 21: 15-19.
- Riojas VVM, Gómez DFJC, Salinas MJA, Montes de Oca LR, Wong GA (2006) Confiabilidad del análisis de ADN en pruebas de paternidad para bovinos Brahman y Brangus en México. *Ciencia UANL. IX*: 41-50.
- SAGARPA (2006a) *Crecen en 300 por ciento las exportaciones de carne bovina Mexicana a Japón en 2005*. N° 084/06. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.gob.mx
- SAGARPA (2006b) *Preven exportar este año más de 12 mil toneladas de carne de bovino en cortes finos a Japón*. N° 254/06. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.gob.mx
- Sallam KI, Morshedy AEM (2008) Organochlorine pesticide residues in camel, cattle and sheep carcasses slaughtered in Sharkia Province, Egypt. *Food Chem.* 108: 154-164.
- Schwägele F (2005) Traceability from European perspective. *Meat Sci.* 71: 164-173.
- Shackell GH, Dodds KG (2008) DNA-based traceability of meat. En Toldra F (Ed.) *Meat Biotechnology*. Springer. Nueva York, USA. pp. 61-88.
- Shackell GH, Mathias HC, Cave VM, Dodds KG (2005) Evaluation of microsatellites as a potential tool for product tracing of ground beef mixtures. *Meat Sci.* 70: 337-345.
- Sifuentes-Rincón AM, Parra BPGM, De la Rosa RXF, Sánchez VA, Serrano MF, Rosales AJ (2006) Importancia de las pruebas de paternidad basadas en microsatélites para la evaluación genética de ganado de carne en empaque múltiple. *Téc. Pecu. Méx.* 44: 389-398.
- Smith GC, Saunders L (2005) International Identification, Traceability and Verification: The Key Drivers and The Impact on the Global Food Industry. International Livestock Congress Connections. *Exploring Traceability and What it Means to the Beef Industry*. 02/03/2005. Houston, TX, EEUU.
- Smith GC, Tatum JD, Belk KE, Scanga JA, Grandin T, Sofos JN (2005) Traceability from a US perspective. *Meat Sci.* 71: 174-193.
- Sofos JN (2008) Challenges to the meat safety in the 21<sup>st</sup> century. *Meat Sci.* 78: 3-13.
- Stanford K, Stitt J, Kellar JA, McAllister TA (2001) Traceability in cattle and small ruminants in Canada. *Rev Sci Tech.* 20: 510-522.
- Yordanov D, Angelova G (2006) Identification and traceability of meat and meat products. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 20: 3-8.

## TRACEABILITY OF BOVINE MEAT: CONCEPTS, TECHNOLOGICAL ASPECTS AND PERSPECTIVES FOR MEXICO

Roberto Rodríguez-Ramírez, Aarón F. González-Córdova, Ana Arana, Armida Sánchez-Escalante and Belinda Vallejo-Cordoba

### SUMMARY

*Bovine meat traceability is of great importance as a tool for food safety since it ensures product identity and the possibility to follow it up from its origin until commercialization. Meat traceability starts with animal identification; however, traditional markers, although necessary, are removed at slaughter. On the other hand, methods that use molecular markers, based on DNA fingerprinting, are permanent and unique. Therefore, it is important that a meat traceability system combines both methods so that the product could be traced along the production chain to ensure consumer safety in case of a food crisis. In this review, a general overview of bovine meat traceability concepts and technological aspects are presented. Also, methods used for meat traceability, including the selection and evaluation of molecular markers are discussed. Finally, the status of bovine meat traceability in different countries, with special emphasis on Mexico is addressed.*

## TRAÇABILIDADE DA CARNE DE BOVINO: CONCEITOS, ASPECTOS TECNOLÓGICOS E PERSPECTIVAS PARA O MÉXICO

Roberto Rodríguez-Ramírez, Aarón F. González-Córdova, Ana Arana, Armida Sánchez-Escalante e Belinda Vallejo-Cordoba

### RESUMO

*A traçabilidade da carne de bovino é de grande importância para a segurança alimentar, já que garante sua identidade e rastreabilidade desde a origem até a comercialização. A traçabilidade começa com a identificação dos animais; no entanto, os marcadores clássicos, ainda que necessários, são removidos durante o sacrifício. Por outro lado, os métodos que utilizam marcadores moleculares, baseados no perfil do ADN, são permanentes e únicos. Por isto, em um sistema de traçabilidade para a carne é conveniente que ambos métodos se complementem para assegurar o acompanhamento do produto em toda a cadeia produtiva. Nesta revisão se sugere um panorama geral de conceitos e aspectos tecnológicos da traçabilidade da carne de bovino, se descrevem os principais métodos utilizados para a traçabilidade, incluindo a seleção e avaliação de marcadores moleculares, e se apresentam as perspectivas da traçabilidade em diferentes países, enfatizando o caso do México.*

# Capítulo 4

## **Meat Molecular Traceability for Beef from Mexican Bovine Synthetic Breeds**

**Artículo enviado y preparado conforme al formato de la revista Genetics  
and Molecular Research**

Your article "Meat Molecular Traceability for Beef from Mexican Bovine Synthetic Breeds" was received as a submission for publication in *Genetics and Molecular Research* (GMR). It has been assigned manuscript number **GMR 1186**. Please use this number for any future correspondence.

**We would like to inform you that by the time your paper is approved by our editorial board, you will have to pay our fee of US\$ 500.00 that will be billed to you if your paper will be accepted for publication.**

Your paper is now being reviewed by the editors and will subsequently be sent to referees for peer review. We will keep you informed about its progress.

The paper will be published on Issue 9, 2010.

If you have any questions, please contact me at [gmr@funpecrp.com.br](mailto:gmr@funpecrp.com.br).

Please, send us an email saying that you are aware about the value of the publication fee.

**I would like to ask you for the cover letter signed by all the authors and for the figures in .jpg format.**

Sincerely,

Francisco A. de Moura Duarte  
Editor - *Genetics and Molecular Research*  
[www.funpecrp.com.br/gmr](http://www.funpecrp.com.br/gmr)  
Phone: 55(16) 3620.1251 fax: 55(16) 3621.1991



## **Meat Molecular Traceability for Beef from Mexican Bovine Synthetic Breeds**

Running Title: **Meat Molecular Traceability for Beef**

**Rodríguez-Ramírez, R<sup>1</sup>, A. Arana<sup>2</sup>, L. Alfonso<sup>2</sup>, A. F. González-Córdova<sup>1</sup>, G. Torrescano<sup>3</sup>,  
B. Vallejo-Cordoba<sup>\*1</sup>.**

<sup>1</sup>.-Laboratorio de Calidad, Autenticidad y Trazabilidad de los Alimentos <sup>3</sup>.-Laboratorio de Ciencia de la Carne. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) Carretera a La Victoria K.m.0.6 Apartado 1735, Hermosillo Sonora México, C.P.83304.

<sup>2</sup>.- Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra, Campus de Arrosadía. Pamplona, España C.P. 31006

\* Corresponding author: [vallejo@ciad.mx](mailto:vallejo@ciad.mx)

Tel.- +52(662)289-2400 Local 365; Fax.- +52(662)280-0421

Manuscript submitted to the Editor of *Genetics and Molecular Research* for evaluation.

December, 2010

### **ABSTRACT**

Traceability ensures a link among the carcass, quarters, or pieces of beef, and the individual animal or the group of animals from which they are derived. Meat traceability is an essential tool for the successful identification and recall of contaminated products from the market during a food crisis. Additionally, meat traceability is also extremely important for the protection and value enhancement of good quality brands. Molecular meat traceability would allow the verification of conventional methods used to implement beef traceability in Mexican synthetic bovine breeds. Thus, a set of eleven microsatellites was evaluated for their ability in the identification of animals belonging to these synthetic breeds. The use of at least seven microsatellite markers allowed gathering enough information for sample discrimination with a match probability (MP), defined as the probability of finding two individuals sharing by chance the same genotypic profile, of  $10^{-8}$ . Also, the practical application of the marker set was evaluated by testing samples from carcasses and pieces of meat at the slaughterhouse and the point of sale. The DNA profiles of the two samples obtained at different points in the production-commercialization chain proceed from the same animal.

**Key words:** meat traceability, microsatellite markers, synthetic breeds.

## Introduction

Food safety and food quality have become a priority for consumers and meat producers. To guarantee both quality and safety, it must be possible to follow the path of a specified piece of meat back to any point the supply chain (Vázquez et al., 2004). The meat industry has responded globally to a series of crises such as bovine spongiform encephalopathy, labeling scandals and outbreaks of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. As a consequence, considerable effort has been expended to develop meat traceability schemes that document the origin and movement of animals and their parts along all or part of the food supply chain. Such schemes are now required by regulations in the European Union (EU) and Japan (Vetharaniam et al., 2009). Likewise, in Latin American countries such as Uruguay, Brasil, Argentina, Chile and México, where the beef export market is important, animal identification was introduced as a first step in the implementation of a meat traceability system (Rodríguez-Ramírez et al. 2010). Internationally, the USA is lagging behind many countries in developing traceability systems for food in general and especially for livestock (Smith et al., 2005).

Traceability is critical for the successful identification and recall of contaminated products from the market during a food crisis and as a support for quality assurance. Additionally, traceability is also extremely important for the protection and value enhancement of brands, especially in niche markets (Vetharaniam et al., 2009). For example, a label such as Ternera de Navarra (Beef of Navarra), a protected geographical indication (PGI) in the North of Spain, is certified by using DNA markers (Arana et al., 2002). The concept of traceability throughout the food supply chain is recognized within the European Union with the regulation (EC) No. 178/2002, in which traceability is defined as the ability to trace and follow food, feed and ingredients through all stages of production, processing and distribution (Orru et al., 2006). These regulations seek to guarantee a traceability system that ensures a link among the carcass, quarters, or pieces of beef, and the individual animal or the group of animals from which they are derived. Therefore, traceability is achieved by making use of identification labels attached to live animals and meat products throughout the production commercialization chain (Vazquez et al., 2004).

As a consequence, traceability requires systems for animal identification and registration and for labeling animal products. Such information is normally obtained by ear tagging the animals, by labeling food and feed placed on the market and by producing documents that allow the identification of all parts in the operation. However, with these methods frauds are not fully avoided (Orru et al, 2006). On the contrary, DNA-based traceability systems or molecular traceability offer a unequivocal verification tool (Arana et al., 2002). Meat traceability studies differing in the number of microsatellites used, optimization of PCR conditions aiming at carrying out multiplex reactions and cattle breeds were recently reviewed [Rodríguez-Ramírez et al, 2010]. While in one study, eight microsatellites were used for the certification of Ternera de Navarra (Beef of

Navarra) from the *Pirenaica* breed [Arana et al., 2002], others evaluated a larger number of microsatellites in several Italian cattle breeds [Orri et al., 2006; Dalvit et al., 2008 a,b]. In one study, 21 microsatellites were tested for breed identification in four native Italian cattle breeds [Dalvit et al., 2008a]; the marker sets with the highest gene diversity were shown to perform best. As a result, the same group evaluated 12 microsatellites in six Italian cattle breeds aiming at reducing the costs of the analysis but considering genetic differentiation among them and found that a set of 8 microsatellites showed reliable results [Dalvit et al., 2008b]. In all these studies pure cattle breeds were evaluated. However, in México beef derives from synthetic bovine breeds such as Brangus, Brahman (Méndez et al 2009) and Charolais. Synthetic breeds were developed by crossing zebu and taurine cattle and were claimed to have both high resistance to heat characteristic of Indian cattle and high productivity characteristic of European cattle (Bicalho et al., 2006). Thus, the objective of this study was to select a subset of microsatellite markers from a panel of eleven for the establishment of meat molecular traceability for beef from Mexican synthetic bovine breeds. Additionally, the practical application of the traceability system was tested with samples collected from the retail market.

## Materials and Methods

**Population studied.** Seventy eight animals of synthetic cattle breeds from two different slaughterhouses were included in the study. Additionally, four meat samples were collected from the local market where these beef is commercialized. Blood and muscle tissue samples were frozen at – 20 °C until DNA extraction was carried out.

**DNA analysis.** Muscle tissue (100 mg) were homogenized in 680 µL lysis buffer (50mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 100mM EDTA, 1% SDS). Then, 20 µL de proteinase K were added and the homogeneate was incubated at 62 °C for 90 min. DNA purification was carried out by the chloroform-isoamyl alcohol standard protocol. DNA from blood samples (100 µL) was extracted using a commercial kit (Wizard Genomic, Promega, Wisconsin, USA). DNA from each individual was independently typed for eleven microsatellites (Table 1). From the microsatellites evaluated, nine were those recommended by the International marker set of ISAG. The primer sequence of the microsatellites can be found in a webpage ([www.isag.org.uk/journal/comparisonguide](http://www.isag.org.uk/journal/comparisonguide)). PCR reactions were carried out by using a commercial kit of fluorescent primers following the manufacturer's instructions (Stock Marks, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR reactions were carried out using a thermocycler (9700 Applied Biosystems, San Diego, CA) with the following conditions: initial denaturation step of 15 min at 95 °C; 31 cycles as follows: 45 s at 94 °C, 45 s at 61 °C with a 30 s ramp, 60 s at 72 °C with a 30 s ramp, 1 cycle of 60 min at 72°C and 1 cycle of 2 h at 25°C. PCR products were analyzed using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, San Diego, CA). Sequencing profiles were analyzed by using a Genescan and Genotyper software (Applied Biosystems).

**Statistical analysis.** Genetic variability of markers were analyzed aiming to validate the selected microsatellites. Average heterozygosity (H) and average polymorphism information content (PIC) were calculated with the software Molkin 3.0 (Gutiérrez *et al.*, 2005). Values of match probability (MP), defined as the probability of finding two individuals sharing by chance the

same genotypic profile, were calculated according to Weir (1996) and Arana et al (2002). Match probability values were calculated using different marker sets, starting with the most polymorphic marker and adding sequentially the next most polymorphic.

## Results and Discussion

Allele frequencies, H and PIC for the markers analyzed in the Mexican synthetic bovine breed are shown in Table 2. All evaluated microsatellites were polymorphic and contained between five and 19 alleles. PIC and H data showed that the least polymorphic marker was BM1824, with values of 65.2 and 70.1, respectively. On the other hand, the most polymorphic marker was BM2113, with values of 84.2 and 85.8 for PIC and H, respectively. Other authors also reported very low values for marker BM1824 (PIC = 55.9) in cattle from pure Italian *Chianina* breed (Orru *et al.*, 2006). On the other hand, BM1824 was not the least polymorphic when it was evaluated in beef from *Pirenaica* breed (Arana *et al.*, 2002) and *Asturiana de los Valles* and *Asturiana de la Montaña* breeds (Vázquez *et al.*, 2004).

MP with different number of markers for the population under study is shown in Figure 1. The MP value for the most polymorphic marker (BM2113) was 3.66. On the other hand, the MP value for the 11 markers was  $1.149 \times 10^{-11}$ . These results were similar to those reported by other authors for Spaniard (Vázquez *et al.*, 2004) and Italian breeds (Orru *et al.*, 2006; Dalvit *et al.*, 2008a,b). As expected, MP diminishes with an increasing number of markers, down to a probability of  $10^{-11}$ . Results showed that the probability of two different animals sharing the same allelic profile (MP) was  $9.96 \times 10^{-8}$  with a set of seven markers. Similarly, other studies showed an MP of  $10^{-8}$  when eight markers were used (Dalvit *et al.*, 2008b; Arana *et al.*, 2002). Although, others reported the use of six markers with an MP of  $10^{-4}$  with the purpose of saving testing cost (Vázquez *et al.*, 2004). In this study a set consisting of seven markers was found to be suitable for meat traceability studies. To test the reliability of the marker set for meat traceability, the task consisted in determining whether or not two samples obtained at different points along the production-commercialization chain proceed from the same animal. To solve this task, allelic profiles obtained from samples collected from the point of sale and the slaughterhouse were compared. A typical allelic profile showing that a sample collected in the slaughterhouse (Figure 2A) and the point of sale (Figure 2B) coincided in all alleles is presented in Figure 2. Thus, it was concluded that the meat samples collected from the point of sale corresponded to the tested animal at the slaughterhouse.

## Conclusions

The verification of meat traceability in synthetic bovine Mexican breeds may be reliably carried out with a subset of seven microsatellite markers from the eleven markers evaluated. Additionally, the usefulness of molecular traceability was shown by comparing samples collected from different locations of the production-commercialization chain.

## Acknowledgements

This research was supported by grant 122204 “Apoyos Complementarios para la Actualización de Equipo Científico 2009” from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). The technical assistance of Lilia María Beltrán-Barrientos and María de Jesús Torres-Llanez is gratefully recognized.

## References

- Arana, A, Soret, B, Lasa I, Alfonso L (2002). Meat traceability using DNA markers: application to the beef industry. *Meat Sci.* 61: 367-373.
- Bicalho, HMS, Pimenta, CG, Mendes, IKP, Pena, HB, et al. (2006). Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers. *Genet. Mol. Res.* 5:432-437.
- Dalvit, C, De Marchi, M, Dal Sotto, R, Gervaso, M, et al. (2008a). Breed assignment test in four Italian beef cattle breeds. *Meat Sci.* 80:389-395.
- Dalvit, C, De Marchi M, Targhetta C, Gervaso M, et al. (2008b). Genetic traceability of meat using microsatellites markers. *Food Res Int.* 41: 301-307
- Gutiérrez, JP, Royo, LJ, Álvarez I, Goyache F (2005). MolKin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*, 96: 718-721.
- Méndez RD, Meza C O, Berruecos, J. M., Garcés, P, et al. (2009). A survey of beef carcass quality and quantity attributes in Mexico. *J Anim Sci.* 87:3782-3790.
- Orru L, Napolitano F, Catillo G, & Moioli B (2006). Meat molecular traceability: How to choose the best set of microsatellites *Meat Sci.* 72:312–317.
- Rodriguez-Ramírez, R, González-Córdova, AF & Vallejo-Cordoba, B. (2010). Authentication and traceability of foods from animal origin by PCR-based capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*
- Smith, GC, Tatum, JD, Belk, KE, Scanga, JA, et al. (2005). Traceability from a US perspective. *Meat Sci.* tica Chimica Acta. In press.71:174-193.
- Vázquez JF, Pérez T, Ureña F, Gudín E (2004). Practical Application of DNA Fingerprinting To Trace Beef. *Journal of Food Protection*, 67: 972–979.
- Vetharanim, I., Shackell, GH. & Upsdell, M. (2009). A statistical approach to identifying the batch of origin of mixed-meat products using DNA profiles. *J. Food Protection* 72:1948-1957.

Weir, BS (1996). Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sunderland, MA, Sinauer Associates. Inc. Publishers.

**Table 1.** Microsatellites evaluated in Mexican synthetic bovine breed.

**Table 2.** Allele frequencies (mean) of markers evaluated in the Mexican synthetic bovine population

**Figure 1.** Probability of two samples matching by chance as a function of number of microsatellite markers evaluated.

**Figure 2.** Allelic profiles of microsatellite markers obtained from samples collected from the production-commercialization chain. A) A sample collected from the slaughterhouse; B) A sample collected from the point of sale.

<b>Marker</b>	<b>Chromosome</b>	<b>Fragment size (bp)</b>
TGLA227	18	74-104
BM2113	2	125-143
TGLA53	16	144-190
ETH10	4	210-226
SPS115	15	240-262
TGLA126	20	109-127
TGLA122	21	130-164
INRA23	3	197-223
ETH3	19	117-129
ETH225	9	140-156
BM1824	1	178-190



Marker	Alleles amplified																		H	PIC
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15-16	17	18	19		
ETH3	0.028	0.007	0.025	0.361	0.160	0.076	0.007	0.208	0.014	0.014									77.8	74.8
ETH225	0.146	0.007	0.076	0.049	0.208	0.264	0.021	0.146	0.076	0.007									83.0	80.9
BM1824	0.132	0.257	0.431	0.007	0.174														70.1	65.2
TGLA126	0.007	0.389	0.250	0.056	0.056	0.194	0.007	0.028	0.014										74.1	70.2
TGLA122	0.028	0.021	0.007	0.007	0.333	0.014	0.014	0.063	0.229	0.083	0.007	0.014	0.090	0.021	0.021	0.007	0.014	0.007	81.4	79.4
INRA023	0.007	0.021	0.021	0.083	0.035	0.042	0.181	0.111	0.076	0.097	0.313	0.014							83.1	81.4
TGLA227	0.364	0.053	0.174	0.182	0.030	0.023	0.091	0.045	0.008	0.015	0.015								78.9	76.4
BM2113	0.067	0.144	0.008	0.197	0.159	0.076	0.061	0.159	0.136										85.8	84.2
TGLA53	0.143	0.014	0.279	0.121	0.079	0.014	0.157	0.057	0.064	0.043	0.007	0.007	0.007	0.007					84.7	83.0
ETH10	0.007	0.132	0.042	0.063	0.069	0.493	0.049	0.097	0.049										71.5	69.3
SPS115	0.014	0.072	0.464	0.130	0.145	0.051	0.036	0.087											73.0	70.4

H, average heterozygosity  
PIC, polymorphism information content

