

PROYECTO MEJORA DE LAS ECONOMÍAS
REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL

—
DETECCIÓN
DE ALÉRGENOS,
ORGANISMOS
GENÉTICAMENTE
MODIFICADOS (OGM)
E IDENTIFICACIÓN
DE ESPECIES EN
ALIMENTOS POR
BIOLOGÍA MOLECULAR

CUADERNO TECNOLÓGICO N° 10

Autores:

Bert Popping

Doctor en Microbiología, Biología Molecular,
Inmunología y Química Biológica

Carmen Díaz Amigo

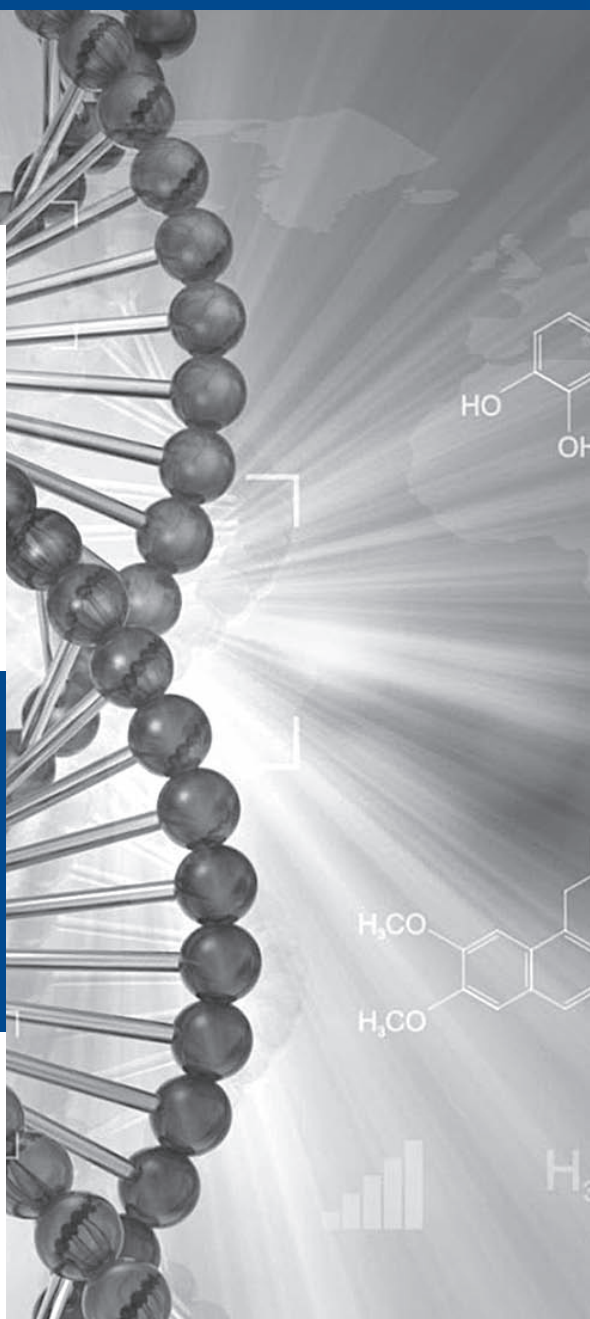
Doctora en Ciencias de la Alimentación

Expertos provistos en el marco del contrato
con Eptisa de España

Octubre de 2014



Unión Europea



PROYECTO MEJORA DE LAS ECONOMÍAS
REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL



Unión Europea

Delegación de la Comisión Europea en Argentina
Ayacucho 1537
Ciudad de Buenos Aires
Teléfono (54-11) 4805-3759
Fax (54-11) 4801-1594



INTI



Instituto Nacional de Tecnología Industrial
Gerencia de Cooperación Económica e Institucional
Avenida General Paz 5445 - Edificio 2 oficina 212
Teléfono (54 11) 4724 6253 | 6490
Fax (54 11) 4752 5919

www.ue-inti.gob.ar

CONTACTO

Información y Visibilidad: Lic. Gabriela Sánchez
gabriela@inti.gob.ar

—
DETECCIÓN
DE ALÉRGENOS,
ORGANISMOS
GENÉTICAMENTE
MODIFICADOS (OGM)
E IDENTIFICACIÓN
DE ESPECIES EN
ALIMENTOS POR
BIOLOGÍA MOLECULAR

CUADERNO TECNOLÓGICO N° 10

Autores:

Bert Popping

Doctor en Microbiología, Biología Molecular,
Inmunología y Química Biológica

Dra. Carmen Díaz Amigo

Doctora en Ciencias de la Alimentación

Expertos provistos en el marco del contrato con Eptisa
de España

Octubre de 2014



INTI



Unión Europea

INDICE

1. PRESENTACIÓN	6
2. RESUMEN	8
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1 Introducción a los alérgenos de alimentos	9
3.1.1 ¿A quiénes afectan las alergias alimentarias?	
3.1.2 Cómo evitar reacciones alérgicas	
3.1.3 Legislación	
3.1.4 Análisis de alérgenos de alimentos	
3.2 Introducción a los Organismos Genéticamente Modificados (OGM).....	14
3.2.1 Producción y usos de los OGM	
3.2.2 El problema de los OGM	
3.2.3 Etiquetado de los OGM	
3.2.4 Análisis de OGM	
3.3 Introducción al fraude e identificación de carne de especies animales.....	17
3.3.1 ¿A quiénes afecta el fraude?	
3.3.2 Legislación	
3.3.3 Determinación analítica de fraude – Identificación de carnes de especies animales y vegetales	
4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	21
4.1 PCR y PCR en tiempo real	21
4.1.1 Características de las técnicas de PCR	
4.1.2 Interpretación de los resultados de PCR estándar en gel de agarosa	
4.2 PCR y la contaminación	25
4.3 Infraestructura de un laboratorio de biología molecular destinado al análisis mediante PCR.....	26
4.4 Estadísticas: la importancia del muestreo e incertidumbre de la medición.....	28
5. PROTOCOLOS DE LABORATORIO	30
5.1. Homogeneización y preparación de muestras para su análisis mediante técnicas de la PCR	30
5.2. Extracción de ADN de ingredientes y muestras de alimentos.....	30
5.2.1 Consideraciones previas	
5.2.2 Procedimiento	
5.3 Medición de la calidad y cantidad de ADN.....	32
5.3.1 Medición de la concentración de ADN	
5.3.2 Medición de la calidad de ADN	
5.4. Preparación de la PCR convencional y PCR en tiempo real.....	33
5.4.1 Consideraciones	
5.4.2 Preparación de la mastermix (mezcla maestra) y reacciones individuales	
5.4.3 Programa de PCR	
5.5 Preparación de geles de agarosa para visualizar productos de la PCR	34
5.5.1 Preparación del gel	
5.5.2 Preparación de las muestras y marcadores. Proceso de electroforesis	
5.6 Preparación de la PCR-RFLP	37
5.6.1 Preparación de la reacción de RFLP	
6. FUENTES ADICIONALES DE INFORMACIÓN	38
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
8. ANEXOS	40
8.1 Anexo 1 - Listas de reactivos y equipos para la extracción de ADN (Método CTAB)	40
8.1.1 Equipos y Materiales	
8.1.2 Reactivos de extracción de ADN	
8.1.3 Soluciones necesarias para preparar las soluciones de trabajo	
8.1.4 Soluciones de trabajo	
8.2 Anexo 2 - Lista de reactivos y equipos para la PCR y PCR en tiempo real	42
8.2.1 Equipos	
8.2.2 Reactivos	
8.2.3 Preparación de soluciones	
8.3 Anexo 3 - Reactivos necesarios para la preparación del gel de agarosa	44
8.3.1 Equipos y materiales	
8.3.2 Reactivos	
8.3.3 Preparación de soluciones de trabajo	
8.4 Anexo 4 – Lista de reactivos y equipos necesarios para llevar a cabo la digestión de fragmentos de PCR con enzimas de restricción (RFLP)	46
8.4.1 Reactivos	
8.4.2 Materiales	
9. BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ANEXOS

- Tabla 1 – Lista de alérgenos de alimentos que requieren ser incluidos en las etiquetas de alimentos de acuerdo a la Reglamento europeo (CE) 1169/2011
- Tabla 2 – Alérgenos regulados a nivel mundial
- Tabla 3 – Determinación de la concentración de agarosa en función del tamaño de los fragmentos de ADN
- Tabla 4 – Preparación de muestras para ser cargadas en gel de agarosa
- Tabla 5 – Voltaje recomendado para desarrollar el gel de agarosa en función del tamaño de los fragmentos de ADN esperados y el búfer utilizado.
- Figura 1 – Estrategias de detección de OGM
- Figura 2 – Componentes y pasos de la PCR estándar
- Figura 3 – Componentes y pasos de la PCR en tiempo real
- Figura 4 – Visualización de productos de la PCR en gel de agarosa
- Figura 5 – Áreas de un laboratorio de biología molecular y flujo de muestras
- Figura 6 – Visualización de la integridad de ADN en gel de agarosa
- Figura 7 – PCR (citocromo b) – RFLP con enzimas de restricción (Hinf I, Hae III y Alu I) de muestras de carnes y pescado.
- Anexo 1 – Listas de reactivos y equipos para la extracción de ADN (Método CTAB)
- Anexo 2 – Lista de reactivos y equipos para la PCR y PCR en tiempo real
- Anexo 3 – Reactivos necesarios para la preparación del gel de agarosa
- Anexo 4 – Lista de reactivos y equipos necesarios para llevar a cabo la digestión de fragmentos de PCR con enzimas de restricción (RFLP)

ABREVIACIONES UTILIZADAS

- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- bp** Pares de bases
- CEN** (del inglés) European Committee for Standardization. Comité Europeo de Normalización
- CTAB** (del inglés) Bromuro de cetil trimetilamonio (método de extracción de ADN)
- DOP** Denominación de Origen Protegida
- IGP** Indicación Geográfica Protegida
- EFSa** (del inglés) European Food Safety Authority. Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria
- ELISA** (del inglés) Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
- ENGL** (del inglés) European Network of GMO Laboratories
- EURL-GMFF** (del inglés) European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed.
- IRMM** Institute for Reference Materials and Measurements (Comisión Europea)
- ISO** International Organization for Standardization
- JRC** Joint Research Center (Comisión Europea)
- LFD** (del inglés) Lateral Flow Devices (tiras reactivas inmunológicas)
- MU** (del inglés) Measurement Uncertainty. Incertidumbre de la medición.
- NTC** (del inglés) Non Template Control. Control negativo sin ADN.
- OGM** Organismo Genéticamente Modificado
- ONG** Organizaciones No Gubernamentales
- PCR** (del inglés) Polymerase Chain Reaction, Reacción en Cadena de la Polimerasa
- POD** (del inglés) Probability of Detection. Probabilidad de Detección.
- PyMEs** Pequeñas y medianas empresas
- RASFF** (del inglés) Rapid Alert System for Food and Feed. Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos.
- RFLP** (del inglés) Restriction Fragment Length Polymorphism. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.
- UNG** Uracil N-glicosilasa
- USDA-GIPSA** (del inglés) United States Department of Agriculture - Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration

1. PRESENTACIÓN

La Unión Europea y el INTI firmaron un convenio de financiación destinado a mejorar la competitividad de las miPyMEs del norte argentino acercando respuestas tecnológicas apropiadas al nuevo entorno productivo industrial. Los responsables de la ejecución del Proyecto "Mejora de las Economías Regionales y Desarrollo Local" son el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), en representación del gobierno nacional, y la Delegación de la Unión Europea en Argentina.

Durante más de medio siglo, el INTI ha construido capacidades profesionales e infraestructura tecnológica de relevancia que lo posicionan hoy como actor importante para aportar innovación tecnológica aplicada a los procesos productivos de toda la economía y para el desarrollo de soluciones industriales que incrementen la productividad y la competitividad de la industria nacional.

Con la ejecución de este proyecto se busca acercar la tecnología y las capacidades técnicas a las regiones de menor desarrollo relativo del país, poniendo a disposición de las miPyMEs y Pymes los medios para satisfacer las demandas de mejora de eficiencia y calidad de sus productos y/o servicios para dar un salto cualitativo en cada una de las provincias del NOA y NEA.

Por tanto, a través de un diagnóstico y evaluación de necesidades tecnológicas hecho en articulación con los gobiernos provinciales, se diseñó un plan de acción sectorial que se implementará hasta el 2015, en cinco sectores industriales determinados como prioritarios: industrialización de alimentos, curtiembre, textil, y metalmecánica junto a la gestión medioambiental como eje transversal a los sectores industriales anteriores.

El proyecto Mejora de las Economías Regionales y Desarrollo Local surge como parte de las acciones de vinculación internacional del INTI, en donde la cooperación técnica con organismos públicos y privados del mundo -presentes en el campo tecnológico- favorecen el intercambio de conocimientos como elemento fundamental para el desarrollo industrial local.

En esa dirección, uno de los componentes de este proyecto es la convocatoria de especialistas en diversas temáticas, para cumplir con misiones de trabajo en nuestro país. El objetivo de cada misión es brindar capacitaciones específicas a técnicos de las provincias norteñas, de acuerdo a la especialidad de cada experto, a grupos de trabajo de Centros Regionales de Investigación y Desarrollo así como a Unidades Operativas que conforman la red INTI, y brindar asistencia técnica a las miPyMEs que acompañen el desarrollo de las actividades del proyecto. Además, mantienen entrevistas con actores locales quienes constituyen un recurso esencial y estratégico para alcanzar los objetivos planteados.

La publicación que se dispone a conocer ha sido concebida como resultado de una misión técnica de uno de los expertos intervinientes en este proyecto. Cada experto al finalizar su trabajo en el país, elabora un informe técnico con recomendaciones para el fortalecimiento del sector para el cual fue convocado y que da lugar a la presente producción, editada con el propósito de divulgar los conocimientos a partir de las necesidades

detectadas y los resultados del intercambio efectivo hecho en territorio, conjugando los basamentos teóricos con la realidad local.

Dra. Graciela Muset

DIRECTORA DEL PROYECTO MEJORA DE LAS ECONOMÍAS REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL

El contenido de este documento es responsabilidad exclusiva del autor y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión de la Unión Europea.

2. RESUMEN

Este Cuaderno Tecnológico trata de recopilar la información presentada durante la misión en Argentina de los expertos Dra. Carmen Díaz Amigo y Dr. Bert Popping dentro del Proyecto "Mejora de las Economías Regionales y Desarrollo Local en la República Argentina" financiado por la Unión Europea, como complemento al informe final realizado donde se recoge toda la información recabada durante dicha misión.

Este cuaderno está preparado como manual de referencia para técnicos del INTI de modo que puedan proporcionar asistencia técnica adecuada a los PyMEs. En él se presenta información sobre tres temas diferentes:

- Alérgenos de alimentos
- Organismos Genéticamente Modificados (OGM)
- Fraude e identificación de carne de especies animales

Cada tema incluye una introducción que describe aspectos como la historia, su relevancia, la situación actual, aspectos legislativos y estrategias analíticas.

Aunque las temáticas aquí presentadas son de naturaleza muy distinta, tienen un elemento en común. Tanto los alérgenos como OGM y la identificación de carnes de especies animales se determinan utilizando las mismas técnicas analíticas, inmunoensayos y técnicas basadas en técnicas de ADN, como la PCR. El entrenamiento que tuvo lugar en INTI en septiembre y octubre de 2014 incluyó casi exclusivamente las técnicas de PCR pues en general no son tan dependientes de kits comerciales, como las ELISA, y son más fáciles de desarrollar e implementar en cualquier laboratorio de biología molecular cuya infraestructura cumpla unos requisitos mínimos, como se explicará más adelante en este cuaderno.

Además, en el cuaderno se incluyen numerosas fuentes de información, muchas de acceso público gratuito, donde el lector podrá encontrar información adicional y actualizada.

Los expertos que impartieron el curso, y autores de este cuaderno, entregaron al INTI el libro "Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists" (Popping, Díaz-Amigo, Hoenicke, 2010) en el que se puede profundizar sobre los tres temas presentados en este cuaderno así como las técnicas analíticas asociadas.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 INTRODUCCIÓN A LOS ALÉRGENOS DE ALIMENTOS

Los alérgenos alimentarios están reconocidos como un problema que afecta negativamente a las personas:

- 1) para el paciente alérgico, los alérgenos representan un grave problema de salud cuando se consumen, y
- 2) para el fabricante, los alérgenos no etiquetados presentan un asunto de responsabilidad legal.

3.1.1 ¿A quiénes afectan las alergias alimentarias?

Se estima que las alergias alimentarias afectan al 3-4 % de adultos y a 4-7 % de los niños en los países desarrollados (Wang y Liu, 2011; EAACI, 2013). Las alergias más comunes entre los niños son al huevo, leche, trigo y soja. Estos alérgenos generalmente empiezan a tolerarse en niños con edades comprendidas entre los 5 y 7 años. Las alergias a maní, nueces, pescado y marisco generalmente afectan al paciente de por vida.

Sin embargo, a pesar de que el porcentaje de personas alérgicas parece ser pequeño, el número de personas afectadas indirectamente es significativamente mayor. Entre ellas se incluyen miembros de la familia de la persona afectada, amigos y padres de los amigos, los compañeros del club deporte, entrenadores, maestros de escuela y otros. Todos ellos tienen que asegurarse de que la persona alérgica no consume alimentos que contiene el alérgeno (por ejemplo, en las fiestas de cumpleaños, comidas escolares, visitas, celebraciones, etc.).

3.1.2 Cómo evitar reacciones alérgicas

Desafortunadamente no existe tratamiento para curar las alergias alimentarias. Las personas que saben que sufren de alergias a ciertos alimentos pueden evitar su consumo y de este modo la reacción alérgica. La única herramienta disponible para ellos es la etiqueta de los alimentos, en particular, la lista de ingredientes. Es por esto que la declaración en el rótulo de un alimento de los alérgenos presentes en él es de importancia crítica para las personas alérgicas. Si el alérgeno no está listado la persona alérgica asume que el alimento es seguro para comer.

3.1.3 Legislación

El etiquetado de alérgenos está reglamentado en numerosas jurisdicciones de todo el mundo. La mayoría de los países sigue el estándar de etiquetado de *Codex Alimentarius* (CODEX STAN 1-1985), en el que se listan los 8 grupos de alimentos que causan alergias:

- cereales que contienen gluten; por ejemplo, trigo, centeno, cebada, avena, espelta o sus cepas híbridas, y productos de éstos;
- crustáceos y sus productos;
- huevos y productos de los huevos;
- pescado y productos pesqueros;
- maní, soja y sus productos;
- leche y productos lácteos (incluida la lactosa);
- frutos secos y sus productos derivados;
- sulfitos en concentraciones de 10 mg/kg o más.

Hay que señalar aquí que la lactosa y el gluten provocan intolerancias. La intolerancia al gluten también se conoce como la enfermedad celíaca. Sin embargo, los cereales también pueden causar alergias, aunque no son muy comunes. Varios países cuentan con una lista de etiquetado de ingredientes alergénicos más extensa que la indicada por Codex. En Europa, el reglamento general sobre seguridad alimentaria (CE) 178/2002 exige, en el artículo 14 apartado 1, que sólo se pueden proporcionar al consumidor alimentos que sean seguros. Este punto del reglamento asume solamente al consumidor sano. Sin embargo, en el apartado 3b del mismo artículo, se establece que la información suministrada al consumidor debe permitirle tomar una decisión informada acerca del producto y así evitar los efectos adversos para la salud que supone el consumo de ciertos alimentos y categorías de alimentos.

La información específica sobre el etiquetado de ingredientes alergénicos está recogida en el reglamento sobre la información para el consumidor (CE) 1169/2011 (tabla 1). En ella se indica que es importante que se proporcione a los consumidores, en particular a los que sufren de una alergia o intolerancia alimentaria, información sobre la presencia de aditivos alimentarios, coadyuvantes tecnológicos y otras sustancias o productos con efectos alergénicos o de intolerancia demostrados científicamente, de modo que puedan tomar decisiones informadas sobre los productos que sean seguros para ellos.

El anexo II de este reglamento, en vigor desde el 13 de diciembre de 2014, contiene una lista de 14 grupos de sustancias o productos que causan alergias y que requieren el etiquetado si están presentes en un producto como ingredientes. Este anexo recoge también numerosas exenciones a la obligación de etiquetado, por ejemplo, aceite de soja altamente refinado. El principal motivo para obtener exenciones es el hecho demostrado científicamente de que las proteínas alergénicas en estos derivados están ausentes y por lo tanto no presentan ningún riesgo para la persona alérgica. En Europa el etiquetado de los productos para las personas con intolerancia al gluten está regulada en la actualidad en un reglamento independiente (CE) 41/2009, pero éste será integrado en los próximos años en el reglamento (CE) 1169/2011. Los reglamentos de otros países están listados en la tabla 2.

1. Cereales que contengan gluten (es decir, trigo, centeno, cebada, avena, espelta, kamut o sus variedades híbridas) y productos derivados, salvo:
 - a. jarabes de glucosa a base de trigo, incluida la dextrosa;
 - b. maltodextrinas a base de trigo;
 - c. jarabes de glucosa a base de cebada;
 - d. cereales utilizados para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.
2. Crustáceos y productos a base de crustáceos.
3. Huevos y productos a base de huevo.
4. Pescado y productos a base de pescado, salvo:
 - a. gelatina de pescado utilizada como soporte de vitaminas o preparados de carotenoides;
 - b. gelatina de pescado o ictiocola utilizada como clarificante en la cerveza y el vino.
5. Cacahuets y productos a base de cacahuets.
6. Soja y productos a base de soja, salvo:
 - a. aceite y grasa de semilla de soja totalmente refinados;
 - b. tocoferoles naturales mezclados (E306), d-alfa tocoferol natural, acetato de d-alfa tocoferol
 - c. natural y succinato de d-alfa tocoferol natural derivados de la soja;
 - d. fitosteroles y ésteres de fitosterol derivados de aceites vegetales de soja;
 - e. ésteres de fitostanol derivados de fitosteroles de aceite de semilla de soja.
7. Leche y sus derivados (incluida la lactosa), salvo:
 - a. lactosuero utilizado para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas;
 - b. lactitol.
8. Frutos de cáscara, es decir, almendras (*Amygdalus communis* L.), avellanas (*Corylus avellana*), nueces (*Juglans regia*), anacardos (*Anacardium occidentale*), pacanas [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch], castañas de Pará (*Bertholletia excelsa*), pistachos o alfóncigos (*Pistacia vera*), macadamias o nueces de Australia (*Macadamia ternifolia*) y productos derivados, salvo:
 - a. nueces utilizadas para hacer destilados o alcohol etílico de origen agrícola para bebidas alcohólicas.
9. Apio y productos derivados.
10. Mostaza y productos derivados.
11. Granos de sésamo y productos a base de granos de sésamo.
12. Altramuces y productos a base de altramuces.
13. Moluscos y productos a base de moluscos.
14. Dióxido de azufre y sulfitos en concentraciones superiores a 10 mg/kg o 10 mg/litro

Tabla 1. Lista de alérgenos de alimentos que requieren ser incluidos en las etiquetas de alimentos de acuerdo a la Reglamentación europea (CE) 1169/2011

ALÉRGENOS	Estados Unidos	Canadá	Unión Europea	Sudáfrica	Australia	Japón	Argentina ²	Bolivia	Chile	Colombia	Costa Rica	Cuba	México	Nicaragua	Venezuela
Huevos	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Leche	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Pescado	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Crustáceos	x	x	x	x	x	x ¹	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Frutos secos	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Maní	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Trigo	x					x									
Trigo sarraceno						x									
Cereales que contienen gluten		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Soja	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
Mostaza		x	x												
Apio			x												
Altramuces			x												
Sesamo		x	x		x										
Moluscos			x												
Colorantes							x ³	x							

¹ En Japón los únicos crustáceos sujetos a etiquetado son los cangrejos y las gambas
² En Argentina, la normativa de etiquetado de alérgenos está actualmente suspendida
³ En Argentina, solamente está incluida el colorante tartracina

Tabla 2. Alérgenos regulados a nivel mundial

3.1.4 Análisis de alérgenos de alimentos

Todos los alérgenos de alimentos son proteínas y se utilizan como analito en ciertos sistemas de detección, como se puede ver a continuación. Sin embargo, debido a que las proteínas están codificadas en el ADN, éste también se utiliza como analito indicador de la presencia de alérgenos en muestras de alimentos.

La detección de alérgenos se hace principalmente por cualquiera de las siguientes técnicas analíticas:

- a. Detección de proteínas:
 - ELISA - Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
 - LFD – Tiras reactivas
 - MS - Espectrometría de masas
- b. Detección de ADN:
 - PCR - Reacción en cadena de la polimerasa
 - PCR en tiempo real

Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y desventajas.

Las técnicas de ELISA y LFD, generalmente kits comerciales, se utilizan con mayor frecuencia para la detección de alérgenos. La veracidad de estos métodos es muy alta cuando se analizan materias primas y productos ligeramente procesados. Sin embargo, pueden producirse problemas en muestras de productos altamente procesados, al ser más difícil extraer la proteína alergénica. Productos que son normalmente problemáticos son los productos tratados por calor (ej. horneados) que contienen huevo y/o leche.

La PCR se puede adquirir comercialmente o se puede implementar fácilmente en el laboratorio utilizando los componentes adecuados (véase información más detallada sobre la PCR en la sección 5). Al igual que las técnicas de ELISA, la PCR también funciona bien en el análisis de materias primas y productos poco procesados, siempre que contengan suficiente ADN, en particular productos de origen vegetal (como nueces, soja, etc.). Sin embargo, cuando el ADN está presente en concentraciones muy bajas (y hay alto contenido de proteínas, como en el caso del huevo y la leche), la sensibilidad de las técnicas de PCR suele ser insuficiente. Además, ambientes ácidos (por ejemplo, aderezo de ensalada, mezclas del tomate y cítricos) conducen a la autocatalización del ADN y hacer que la detección de ADN sea difícil o imposible. Situaciones como éstas, en las que los resultados de la PCR son negativos y la concentración de proteínas alergénicas es alta, son particularmente peligrosas (ej., salsas de ensalada que contienen huevo o leche). Es importante resaltar que el ADN en sí no es alergénico y sólo puede servir como un indicador de la presencia de sustancias alergénicas en un producto.

La espectrometría de masas se utiliza generalmente en combinación con cromatografía de líquidos (LC-MS/MS) para detectar las proteínas alergénicas. Esta es una técnica relativamente cara debido al alto precio del equipo y sólo está disponible en un número pequeño de laboratorios. Además, el manejo del equipo y la interpretación de resultados requieren expertos altamente experimentados. Sin embargo, esta tecnología ha demostrado un potencial muy alto para la detección de fragmentos de proteínas alergénicas en muestras donde la PCR y ELISA eran incapaces de hacerlo. Varias publicaciones han demostrado que la MS funciona bien en el análisis de materias primas, productos poco procesados y numerosos productos altamente procesados. Las ventajas adicionales de la MS incluyen la capacidad de automatizar procesos y la posibilidad de detectar numerosos alérgenos simultáneamente en la misma muestra sin incurrir costos adicionales.

Sin embargo, la detección de alérgenos por MS se encuentra todavía en vías de desarrollo y aun requiere optimización de los procesos de extracción así como validación de los métodos.

3.2 INTRODUCCIÓN A LOS OGM

Los organismos genéticamente modificados (OGM) se comercializaron en Europa por primera vez en 1996. El primer producto OGM en aparecer en los estantes de los supermercados fue el **puré de tomate**. Más tarde comenzaron a introducirse en los supermercados otros productos que contienen o están compuestos por OGM, etiquetados y sin etiquetar.

3.2.1 Producción y usos de los OGM

Según el **informe de ISAAA** de 2013, ha vuelto a aumentar la superficie total de cosechas OGM. En 2013 se cultivaron a nivel mundial un total de 175,2 millones de hectáreas de cultivos transgénicos, lo que significa un aumento de 5 millones de hectáreas con respecto a la producción en 2012. Los EE.UU. se mantienen como principal país productor de cultivos GM con un total de 70,1 millones de hectáreas, seguido de Brasil con 40,3 millones y Argentina con 24,4 millones. Los principales cultivos transgénicos en Argentina son soja, maíz y algodón.

Tanto la soja como el maíz son cultivos muy versátiles. Sus productos y derivados se pueden encontrar en muchas formas.

A continuación se muestran algunos ejemplos de productos de la soja y sus derivados:

- Chips de soja
- Copos de grasa completa
- Cáscaras y vainas de la soja
- Harina de soja
- Sémola de soja
- Tortas desgrasadas comestibles
- Aceites para ensaladas
- Esteroles
- Melaza de soja
- Tocoferoles (vitamina E)
- Aceite de soja crudo
- Grasas y margarina
- Grasas para piensos
- Lecitinas
- Aislados de proteínas de soja
- Proteínas de soja texturizadas
- Isoflavonas de soja
- Harina de soja

Los siguientes son ejemplos de productos derivados del maíz:

- Aceite
- Proteínas
- Fibras
- Germen de maíz prensado
- ~~Derivados~~ Derivados de semollos de maíz
- Almidón pre gelatinizado
- Almidones industriales modificados
- Jarabe de alto contenido en fructosa
- Dextrosa
- Jarabe de Glucosa
- ~~Maltodextrinas~~ Maltodextrinas
- Color caramelo

3.2.2 El problema de los OGM

Los alimentos OGM (también llamados alimentos transgénicos) se convirtieron en una preocupación pública principalmente como consecuencia del movimiento impulsado por organizaciones no gubernamentales (ONG), como Greenpeace y Amigos de la Tierra. Como consecuencia, la maquinaria legislativa europea se puso en marcha para permitir a los consumidores hacer una elección informada sobre el consumo de estos productos. El etiquetado de los alimentos transgénicos sólo es aplicable para aquellos OGM que hayan pasado por un proceso de aprobación. Este proceso difiere en los Estados Unidos de América y Europa. Los OGM no aprobados, como el arroz chino BT63, están sujetos a tolerancia cero y no se permiten en los mercados europeos. Cuando los arroces transgénicos no aprobados en Europa, LLRICE 601 (producido en EE.UU.) y BT63 (producido en China), se encontraron en los mercados europeos en 2009, la Comisión Europea implementó **medidas de emergencia** para reducir la exposición del mercado europeo a estas variedades de arroz GM.

A diferencia de los alérgenos, los OGM aprobados no se consideran un problema para la salud, de acuerdo con la evaluación científica realizada por la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA). El etiquetado de los OGM se lleva a cabo porque la **Unión Europea reconoce el derecho de los consumidores a la información** y el etiquetado es una herramienta disponible para permitir realizar una decisión informada.

3.2.3 Etiquetado de los OGM

Desde 1997 la legislación europea ha hecho obligatorio el etiquetado de los alimentos GM en los siguientes casos:

- Productos que se componen de OGM o contienen OGM;
- Productos derivados de OGM que, aunque no tengan el ingrediente OGM, contienen presencia de ADN o proteínas resultantes de la modificación genética.

En los últimos años las normas de etiquetado de los OGM se han ido actualizando y los reglamentos actuales son **CE 1829/2003** y **CE 1830/2003**.

El Reglamento CE 1829/2003 se ocupa principalmente de la autorización y supervisión de los OGM destinados a la alimentación y también trata aspectos del etiquetado. Este Reglamento establece el umbral para el etiquetado de ingredientes GM cuando su contenido es superior a 0,9 %.

El Reglamento CE 1830/2003 se ocupa principalmente de la trazabilidad y el etiqueta-

do de los alimentos derivados de, o que contengan, OGM.

La Comisión Europea, bajo la dirección del Centro Investigación JRC de Ispra en Italia, ha establecido una red de laboratorios, principalmente gubernamentales, que evalúan los métodos analíticos y materiales proporcionados por las compañías de biotecnología productoras de OGM como parte del proceso de aprobación de OGM. Estos laboratorios también desarrollan métodos analíticos para OGM no autorizados que pueden entrar en el mercado. El JRC también sirve como laboratorio de referencia europeo (EURL) para el análisis de OGM.

El etiquetado de los OMGs en los productos alimenticios se realiza a nivel de ingredientes. También se requiere el etiquetado de aquellos productos donde no se detecta OGM analíticamente (proteínas o ADN), pero que, a partir de la trazabilidad de los ingredientes, se sabe que el material usado derivó originalmente de un OGM. Sin embargo, hay algunas excepciones como se indica en los dos Reglamentos citados anteriormente. Información adicional sobre el etiquetado de semillas, alimentos y piensos se puede encontrar en la página de la Comisión Europea sobre el etiquetado de alimentos y piensos GM (http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/gmfood/labelling_en.htm).

En el caso de productos que no estén aprobados para el mercado europeo, la Comisión Europea tiene un procedimiento de notificación para alertar a otros Estados miembros sobre la presencia e identificación de productos que no cumplen la legislación vigente. Este procedimiento abarca no solamente a los OMG sino también que también a otros materiales legislados como alérgenos, pesticidas, micotoxinas, patógenos, etc. Este sistema se conoce con las siglas RASFF (Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos, http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm) y contiene una base de datos pública. La evaluación de la información sobre OGM en la base de datos RASFF demuestra que la presencia de ciertos OGM no aprobados sigue generando alertas y siguen siendo un problema. Un ejemplo sobre esta situación concierne al arroz BT63 proveniente de China. Las primeras alertas en RASFF se generaron en 2006 y todavía se siguen produciendo alertas en 2014 en ciertos productos importados. Otros productos, como el calabacín Libertad, han generado alertas sólo durante un corto período de tiempo.

3.2.4 Análisis de OGM

El análisis de OGM se puede realizar mediante técnicas de ELISA para detectar la proteína expresada a partir del gen introducido en la modificación. Sin embargo, las técnicas más comunes son aquellas basadas en la detección por PCR de los elementos genéticos (ADN) de la modificación.

Los elementos que generalmente contiene la modificación del OGM y posibles objetivos de análisis son el promotor, el terminador y el gen portador de la característica de la modificación (trait). Las estrategias de detección de OGM se pueden categorizar según el tipo de elementos que se amplifican (figura 1):

- a) **Screening de OGM:** Si se sospecha la presencia de OGM pero se desconoce que tipos son, los laboratorios suelen comenzar analizando elementos de screening. Esos son comunes a muchos OGM y, por tanto, dan una primera indicación de su

presencia. Tales elementos de screening son las secuencias del promotor (ej. p35S del virus de mosaico de la coliflor) y del terminador (ej. tNOS de *Agrobacterium tumefaciens*). Un resultado positivo en análisis de screening indica la presencia de OGM, sin embargo, no permite identificar el tipo de OGM.

- b) **GM-específico:** Si el elemento transgénico insertado se conoce (por ejemplo, CP4-EPSPS, la modificación Roundup Ready®) se analiza específicamente el gen portador que caracteriza al OGM.
- c) **Modificación específica:** Otra opción es la amplificación de regiones que cruzan el promotor o terminador y el elemento insertado (por ejemplo, p35S -> CP4 EPSPS o bien CP4-EPSPS -> tNOS). El número de organismos transgénicos que lleva esta construcción es muy pequeña. Esta estrategia analítica no proporciona la identificación única del organismo transgénico (pues no indica la línea de la planta, o evento, de que se trata).
- d) **Evento (Línea)-específico:** La única manera de identificar de forma única a un organismo transgénico es mediante la amplificación de una región que incluye ADN de la planta y la construcción transgénica. Esta secuencia sólo estará presente en una transformación específica. Por lo tanto, se llama detección de evento específico.

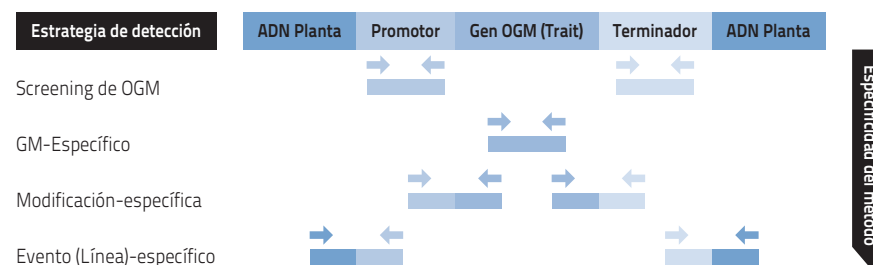


Figura 1. Estrategias de detección de OGM

Dado que el número de OGM está en constante aumento y por razones económicas, es difícil realizar análisis de eventos específicos para cada evento transgénico que está presente potencialmente en una muestra. Por esta razón, los laboratorios suelen comenzar con una combinación de elementos de screening. En función de sus resultados, se reducen las posibilidades de eventos que pueden estar presentes en una muestra.

3.3 INTRODUCCIÓN AL FRAUDE E IDENTIFICACIÓN DE CARNE DE ESPECIES ANIMALES

Uno de los temas importantes en Europa, sobre todo después del escándalo de la carne de caballo en 2012, es el fraude y autenticidad de los alimentos. Esta es una materia de amplio espectro que afecta por igual a los alimentos y productos no alimentarios. Los ejemplos más prominentes de fraude en áreas no alimentarias son los productos texti-

les. Por ejemplo, copias de marcas conocidas que se fabrican típicamente usando materias primas de baja calidad y se venden a precios significativamente más bajos. Otros ejemplos frecuente es el fraude en la industria cosmética. Por ejemplo, se encontraron imitaciones del perfume J'Adore en un mercado semanal en Praga (República Checa) por el equivalente a 5 euros por 100 ml, mientras que el producto original tiene un precio de 80 euros por 50 ml (Popping 2008).

En el sector alimentario, el fraude no es raro tampoco. En el pasado, ha habido un gran número de escándalos, ya sea a nivel mundial o europeo. Por ejemplo, en 1981, aceite de colza adulterado con aceites industriales provocó 20.000 intoxicados y 600 fallecimientos en España. En 2008, leche adulterada con melamina (y residuos de ácido cianúrico) provocó en China 300.000 intoxicados y 6 fallecidos. Muchos de estos afectados con problemas nefrotóxicos fueron niños y bebés. Aunque en mucho de los casos los fraudes solamente tienen implicaciones económicas, hay situaciones, como los dos ejemplos anteriores, en los que problema de autenticidad llevan asociados problemas de salud graves.

El escándalo de la carne de caballo que afectó a los países europeos en 2012, resultó ser fundamentalmente un problema de naturaleza económica. En este caso se encontraron ciertos productos conteniendo carne de caballo de baja calidad, no declarada en la etiqueta, en sustitución de otras carnes, llegando en algunos casos hasta un 60%. Esta situación de engaño no sólo afectó al consumidor sino que también afectó gravemente, entre otros, a algunas de las principales cadenas de comida rápida que venden hamburguesas.

Las causas más frecuentes de adulteración son en su mayoría de naturaleza económica. Actividades fraudulentas incluyen sustitución de ingredientes por otros de menor calidad y precio, dilución de ciertos ingredientes, adición de ciertos compuestos (ej. colorantes, aromas) para enmascarar productos de baja calidad. También se considera fraude el uso indebido de ciertos reclamos en las etiquetas. Por ejemplo, vinos y productos etiquetados bajo denominación de origen (DOP) o indicación geográfica (IGP) falsos.

Los siguientes son productos frecuentemente afectados por actividades fraudulentas en Europa:

- Aceite de oliva
- Pescado
- Productos ecológicos
- Leche
- Cereales
- Miel
- Café y té
- Especias (por ejemplo, azafrán)
- Vino
- Jugos de frutas

3.3.1 ¿A quiénes afecta el fraude?

El consumidor es en última instancia el principal afectado por actividades fraudulentas,

que acaba pagando precios elevados por productos de menor calidad y que, en ciertos casos pueden llegar a afectar a la salud. Además, el fraude también daña significativamente las finanzas y la reputación de la industria en general. Como ejemplo, la venta de hamburguesas congeladas se desplomó un 43% cuando el escándalo de la carne de caballo saltó a los medios de comunicación. Mientras que las grandes compañías tienen, por lo general, los medios económicos para seguir funcionando, pequeñas y medianas empresas pueden verse afectadas severamente llevando a muchas de ellas a la quiebra. Los gobiernos también se ven afectados negativamente por escándalos relacionados con fraude, ya que estos implican costos elevados de investigación, análisis adicionales y revisión de procedimientos, entre otros. Tanto los gobiernos como la industria se ven directamente afectadas por la pérdida de confianza del consumidor en las marcas, el mercado y los sistemas de control.

3.3.2 Legislación

De acuerdo con el artículo 8 del Reglamento general sobre la seguridad de los alimentos CE 178/2002, la legislación alimentaria tiene como objetivo la protección de los intereses de los consumidores y ofrecerles una base para que puedan tomar decisiones informadas en relación con los alimentos que consumen. Además también tiene por objeto la prevención de prácticas fraudulentas o engañosas, como la adulteración de alimentos y cualquier otra práctica que pueda engañar al consumidor. El Reglamento sobre la información facilitada al consumidor (CE) 1169/2011, en vigor desde el 13 de diciembre de 2014, establece, en el artículo 7, que la información sobre alimentos no inducirá a error, en particular:

- a) sobre las características del alimento, en particular sobre su naturaleza, identidad, cualidades, composición, cantidad, duración, país de origen o lugar de procedencia, y modo de fabricación o de obtención;
- b) al atribuir al alimento efectos que no posee;
- c) insinuar que el alimento posee características especiales, cuando en realidad, todos los alimentos similares poseen esas mismas características, en particular poniendo especialmente de relieve la presencia o ausencia de determinados ingredientes o nutrientes;
- d) al sugerir, mediante la apariencia, la descripción o representaciones pictóricas, la presencia de un determinado alimento o ingrediente, cuando en realidad un componente presente de forma natural o un ingrediente utilizado normalmente en dicho alimento se ha sustituido por un componente diferente o un ingrediente distinto.

Como consecuencia del escándalo de la carne de caballo, la Comisión Europea publicó la Recomendación 2014/180/UE sobre el plan coordinado de control con el fin de establecer la prevalencia de prácticas fraudulentas en la comercialización de determinados alimentos.

3.3.3 Determinación analítica de fraude – Identificación de carnes de especies animales y vegetales

En el caso de productos donde ciertas especies animales o vegetales son componentes de primera calidad (como el caso del arroz Basmati, determinadas especies animales, el trigo durum, etc.), se utilizan análisis basados en técnicas de ADN pues permiten identificar con fiabilidad si se ha cometido fraude.

Los analitos objeto de análisis son secuencias del ADN específicas para la especie de interés. La técnica de secuenciación de ADN es la mejor opción para el análisis, pero es cara y no está disponible en todos los laboratorios. Además, no siempre es necesario secuenciar. Hay otras metodologías también basadas en el análisis de ADN de uso más común que nos proporcionan las mismas respuestas. Estas técnicas son:

- PCR convencional
- PCR en tiempo real
- Combinación de PCR convencional seguida de la evaluación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Todas estas tecnologías tienen ventajas y desventajas. Mientras que la PCR es una técnica simple y rentable, pueden resultar inespecífica y en muchos casos requiere una digestión posterior de los productos de la PCR para verificar que el producto amplificado es el esperado.

La PCR en tiempo real es, debido a su tecnología de sondas, mucho más específica, pero tiene un costo más alto y requiere, en comparación con la PCR estándar, equipos más caros y sofisticados.

Ambas técnicas anteriores sólo identificarán aquellas especies animales objeto de análisis y para las que se han utilizado cebadores específicos. Esto significa que si se analiza una muestra de carne de res para evaluar la presencia de carne de cerdo y caballo, pero sólo se utilizan cebadores específicos para cerdo, sólo se identificará la presencia de cerdo, mientras que la carne de caballo permanecerá sin descubrir.

El problema de las carnes no identificadas (por ejemplo, aquellas para las que no existen cebadores) se resuelve a menudo utilizando la combinación PCR-RFLP. Esta técnica se basa en la evaluación una región de ADN común para muchas especies y que se caracteriza por tener una región altamente variable en el medio. Por tanto, mientras que los cebadores amplifican esta región en la mayoría de las especies, la secuencia del ADN amplificado difiere entre especies. Y esta diferencia se hace visible al utilizar enzimas de restricción que cortan los productos de la PCR en sitios específicos de la secuencia del ADN. La fragmentación de ADN resultante genera patrones o perfiles específicos para cada especie analizada, lo que se denomina polimorfismos, y que son visibles como bandas en un gel de agarosa (véase figura 7 en sección 6.6.1). Por lo general se requiere más de una enzima de restricción (cada una digiere el ADN en reacciones independientes) para evitar resultados no concluyentes y poder identificar las especie con certeza pues algunas especies pueden compartir el mismo patrón de restricción con una enzima en particular. Este método es muy útil en la identificación de carnes de especies generalmente no comerciales, como camélidos, para las que aún no se han diseñado los cebadores de PCR específicos de especie.

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.1 PCR Y PCR EN TIEMPO REAL

4.1.1 Características de las técnicas de PCR

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una tecnología que se ha establecido de manera estándar en prácticamente todos los laboratorios de biología molecular. Esta tecnología emplea una enzima específica, la Taq Polimerasa, que permite copiar de manera exponencial una secuencia de ADN diana de interés, lo que permite su visualización. En el caso de la PCR estándar las copias se visualizan en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

La enzima Taq Polimerasa fue aislada originalmente a partir de una bacteria llamada *Thermophilus aquaticus*, capaz de crecer a altas temperaturas en las aguas termales. Actualmente, las Taq Polimerasas comerciales son producidas por microorganismos modificados genéticamente. Los principales componentes de la reacción de PCR son, además de la Taq Polimerasa, los dNTPs (los nucleótidos dATP (contiene A, adenina), dTTP (contiene T, timina), dCTP (contiene C, citosina) y dGTP (contiene G, guanina) necesarios para extender la nueva cadena de ADN, tampón y $MgCl_2$.

La Taq Polimerasa tiene la capacidad de extender cadenas de ADN mediante la adición de nucleótidos a una secuencia de ADN corta (cebador), una vez que éste cebador se haya unido a la región complementaria de ADN. De la misma manera, usando un segundo cebador en dirección aguas arriba el ADN Polimerasa realiza la copia de la segunda cadena de ADN. Ambos cebadores definen la región (longitud y secuencia) de la región de ADN a amplificar. La PCR se realiza normalmente mediante 3 pasos que se repiten durante un número definido de veces (ciclos). Cada paso se caracteriza por realizarse a una temperatura y durante un período de tiempo específicos (figura 2):

1. **Desnaturalización** del ADN (95°C): permite la separación de las dos cadenas de ADN.
2. **Hibridación** (55-65°C) de los dos cebador a regiones complementarias del ADN desnaturalizado (uno en cada cadena)
3. **Extensión** de la cadena de ADN (72°C): el ADN Polimerasa añade nucleótidos a continuación de los cebadores y de manera complementaria a la secuencia del ADN molde.

Después de 35-50 ciclos, se obtienen suficientes copias del ADN para ser visualizadas en un gel de agarosa. El número de copias que produce una PCR es 2^n , donde n es el número de ciclos. Esto significa que por cada copia de ADN molde el número de copias de ADN generadas por una PCR, de por ejemplo 35 ciclos, sería aproximadamente 3×10^{10} . Sin embargo este número es por lo general menor debido a que la eficiencia de la PCR es normalmente menor al 100%. Esto se debe a diversas razones. Entre ellas, los componentes

de la PCR (ej. cebadores, nucleótidos, etc.) se empiezan a agotar a medida que aumenta el número de ciclos. La presencia de inhibidores de la PCR también afecta negativamente a la eficiencia de la PCR. Este es el motivo por el que algunas PCR requieren más de 35 ciclos para mostrar un resultado positivo.

COMPONENTES DE LA PCR

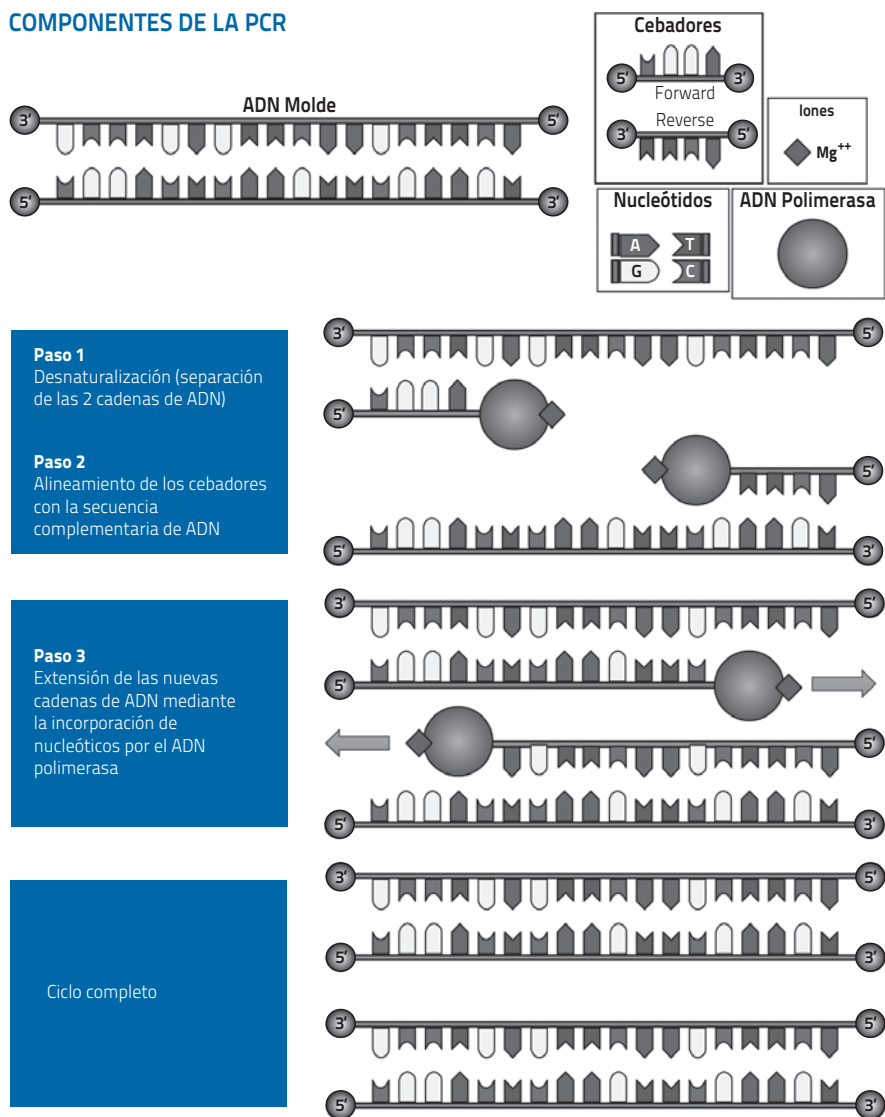


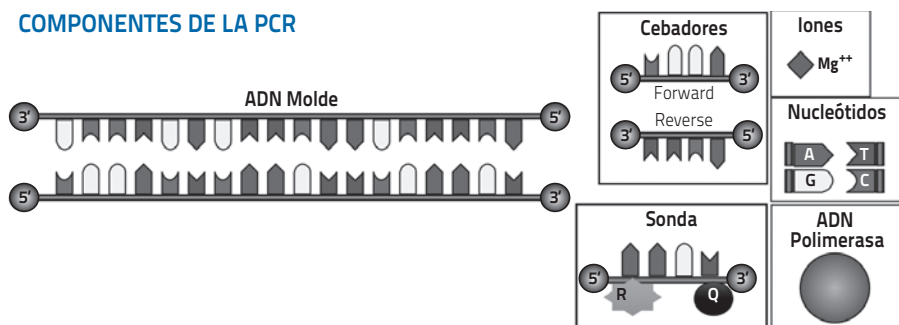
Figura 2. Componentes y pasos de la PCR estándar

Otra forma más sofisticada de la PCR es la "PCR en tiempo real". Aquí, se añade un componente adicional, la sonda (figura 3). Esta es una secuencia de ADN que se une al ADN diana situada entre los dos cebadores. La sonda está unida a un colorante fluorescente en un extremo (Reporter) y en el otro extremo se encuentra un compuesto inhibidor de la fluorescencia (Quencher). Si el compuesto inhibidor se encuentra en la proximidad del colorante fluorescente (que es el caso de una sonda intacta), no se emite fluorescencia. Sin embargo, cuando la Taq Polimerasa extiende la cadena de ADN y se encuentra con la sonda, la digiere (para ello la polimerasa debe tener actividad endonucleasa, requisito para la PCR en tiempo real). Debido a la digestión de la sonda el Quencher se separa espacialmente del Reporter permitiendo que éste emita fluorescencia, la cual puede ser detectada y medida en tiempo real por el equipo de PCR. A medida que la PCR progresa a través de los ciclos, la intensidad de la fluorescencia aumenta de manera proporcional a la concentración de ADN diana presente en la muestra. Como la fluorescencia se puede cuantificar, es posible cuantificar el ADN presente en el ensayo, lo que no es posible en una reacción de PCR estándar.

La PCR en tiempo real tiene una serie de ventajas:

1. Aumento de la especificidad de la PCR. Mientras que en una PCR estándar hay dos elementos que proporcionan especificidad, los dos cebadores, puede que aún exista amplificación no específica. Sin embargo, en la PCR en tiempo real, además de los dos cebadores, el uso de la sonda contribuye de manera significativa a la disminución de la probabilidad de una amplificación no específica, pues son 3 los elementos que tienen que encontrar sus regiones complementarias en el ADN diana.
2. Mientras la PCR en tiempo real y el equipo requerido aumentan los costos del análisis, tiene otra ventaja muy importante: limita el riesgo de contaminación ya que no es necesario abrir los viales que contienen los productos de la PCR.

COMPONENTES DE LA PCR



Paso 1
Desnaturalización (separación de las 2 cadenas de ADN)

Paso 2
Alineamiento de los cebadores y sonda con la secuencia complementaria de ADN.

Paso 3
Extensión de las nuevas cadenas de ADN mediante la incorporación de nucleótidos por el ADN polimerasa. El Reporter (R) se separa del Quencher (Q) y la fluorescencia emitida se mide en tiempo real.

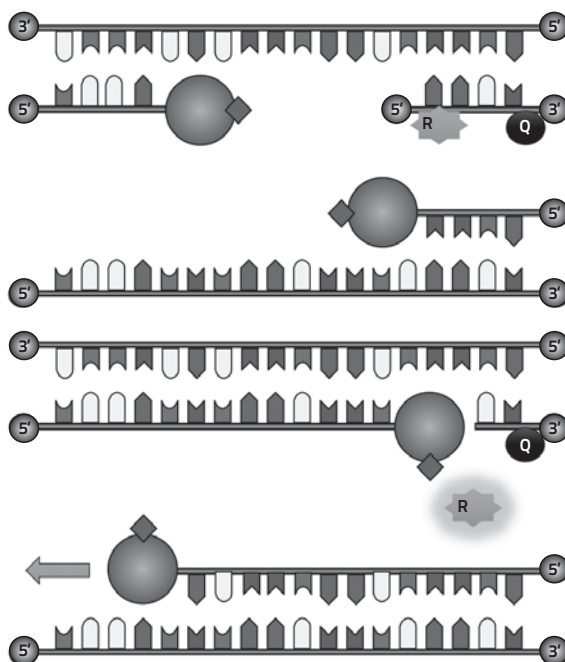


Figura 3. Componentes y pasos de la real time PCR

4.1.2 Interpretación de los resultados de PCR estándar en gel de agarosa

Los productos de la PCR amplificados se visualizan en geles de agarosa. Mediante la aplicación de corriente (electroforesis) los productos de la PCR se desplazan por el gel en función de su tamaño. Una vez separados los productos, se tiñen con bromuro de etidio y se hacen visibles a modo de bandas (líneas cortas) bajo luz ultravioleta (figura 4).

El tamaño del fragmento, en pares de bases (bp), se determina mediante el uso de marcadores o escaleras de ADN, que consisten en una mezcla de fragmentos de ADN de distintos tamaños. Como el análisis de la PCR incluye controles positivos (que contienen la secuencia de interés), la banda de la muestra debe estar a la misma altura en el gel que este control para que sea considerada positiva. Si una muestra presenta una banda a diferente altura en el gel, significa que la PCR amplificó el ADN molde de manera inespecífica. Una de las soluciones para evitar amplificación inespecífica es optimizando el diseño de los cebadores.

Los controles negativos (reacción sin ADN molde y muestra que contiene ADN que carece del gen de interés) no deben mostrar banda alguna.

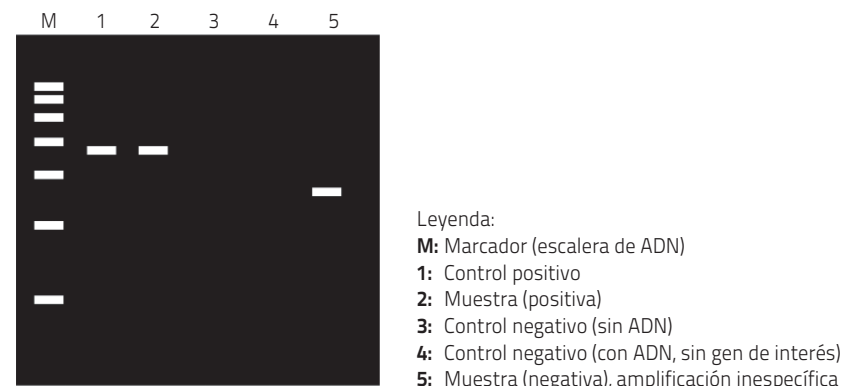


Figura 4. Visualización de productos de la PCR en gel de agarosa

4.2 PCR Y LA CONTAMINACIÓN

El problema más común que puede ocurrir cuando se realiza repetidamente la misma PCR es la contaminación con productos de PCR amplificados anteriormente. Este problema suele ocurrir normalmente cuando se abren los tubos después de realizar una PCR convencional, lo que es necesario para transferir y visualizar los productos de la PCR en un gel de agarosa. Cuando se abre el tubo de la PCR, que puede contener al menos 3×10^{10} copias de ADN, es probable que se produzcan aerosoles conteniendo algunas de estas copias. Si a su vez, éstas caen en un nuevo vial durante la preparación de una nueva PCR (que utilice los mismos cebadores), la reacción será positiva por la amplificación de la contaminación, incluso si la muestra no contiene ADN diana. Una reacción positiva en ausencia de ADN diana da lugar a un falso positivo.

Para evitar la contaminación es útil establecer un proceso en flujo de la muestra, de manera que los distintos pasos de análisis se lleven a cabo de áreas "sucias" a áreas "limpias". Para ello es necesario trabajar en un laboratorio con una infraestructura que

permita tener áreas o habitaciones separadas para llevar a cabo de manera independiente las distintas actividades que requiere la PCR. Además, otra práctica adicional para evitar contaminación incluye el uso exclusivo de batas para cada laboratorio. Por ejemplo, se pueden utilizar batas con códigos de colores de modo que un color se utilice solamente en un laboratorio. Para más detalles consulte la sección 5.3 sobre “la infraestructura de un laboratorio de biología molecular destinado al análisis mediante PCR”.

Más allá de lo que se ha mencionado anteriormente, existen otras formas de reducir la contaminación y el riesgo. La forma más común es mediante el empleo de la enzima **uracil N-glicosilasa (UNG)**. Para ello es también necesario reemplazar el nucleótido dTTP con dUTP de modo que la Polimerasa incorpore U en lugar de T en los nuevos productos de la PCR. En el supuesto de que estos nuevos productos formados, que contienen U, contaminen la siguiente PCR, la enzima UNG, que actúa antes de realizar la PCR, fragmentará el ADN en los lugares que llevan incorporados una U (pero no afecta al ADN molde, que no tiene U). La enzima UNG se desactiva cuando comienza la PCR a 95°C, de modo que tiene lugar la amplificación normal en los que se vuelven a generar productos amplificados que llevan U en lugar de T. Esta medida es relativamente cara para prevenir la contaminación pero en nuestra experiencia una de las mejores soluciones disponibles.

4.3 INFRAESTRUCTURA DE UN LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DESTINADO AL ANÁLISIS MEDIANTE PCR

Como se mencionó en la sección sobre la PCR, la contaminación es un tema crítico en laboratorios de biología molecular porque la contaminación con una sola molécula (por ejemplo a través de aerosol) puede causar un falso positivo.

Para minimizar el riesgo de contaminación deben considerarse varios aspectos. Uno de ellos es la distribución de los laboratorios o establecimiento de áreas de uso exclusivo y que permitan que la muestra siempre transite de áreas sucias a zonas limpias (figura 5):

1. Sala de preparación de muestras. En esta área se saca la muestra de su envase para proceder a su homogeneización. Aquí también es posible iniciar la primera parte de la extracción de ADN (por ejemplo, usando bromuro de cetil trimetilammonio (CTAB)).
2. A continuación, en una zona o habitación separada, el ADN extraído debe ser purificado, ya sea mediante lavados o extracción en fase sólida a base de resinas.
3. Desde aquí, la muestra debe ser trasladada a una sala de preparación de las reacciones de la PCR, donde se combinan el ADN y la mezcla maestra de la PCR. La propia mezcla maestra (contiene búfer de PCR, $MgCl_2$, cebadores, ADN Taq Polimerasa) tiene que ser preparada en una sala limpia separada, donde a excepción de cebadores y sondas no se maneja ningún otro ADN. Una mezcla maestra contaminada dará lugar a que todos o muchos de los resultados sean inválidos.
4. Los viales cerrados que contienen todos los componentes de la PCR, incluido el ADN de la muestra, deben llevarse a la sala donde se encuentra el termociclador

(ya sea termociclador PCR estándar o termociclador PCR en tiempo real), donde se colocan las muestras.

5. Para evaluar los productos de las reacciones de una PCR estándar es necesario cargar las muestras en un gel de agarosa en la sala de electroforesis en gel. La apertura de los tubos de PCR después de una amplificación exitosa puede llevar a un riesgo muy alto de contaminación.

Por este motivo el personal del laboratorio que abre los tubos de reacción post PCR no deberían entrar en las habitaciones anteriores pues pueden contaminar fácilmente el ADN extraído o las mezclas madre. Para evitar esto, se recomienda contar con varios miembros del personal que trabajen en las distintas áreas designadas, es decir, el personal que manipule los tubos post PCR para cargar las muestras en los geles de electroforesis en gel, idealmente, no deberían entrar en las salas de extracción de ADN o preparación de las mezclas madre y las reacciones de la PCR. Si la reacción es una PCR en tiempo real, la amplificación es medida por el termociclador en tiempo real y no hay necesidad de abrir los tubos una vez finalizada la PCR, y por tanto el riesgo de contaminación en este tipo de PCR es mínimo.

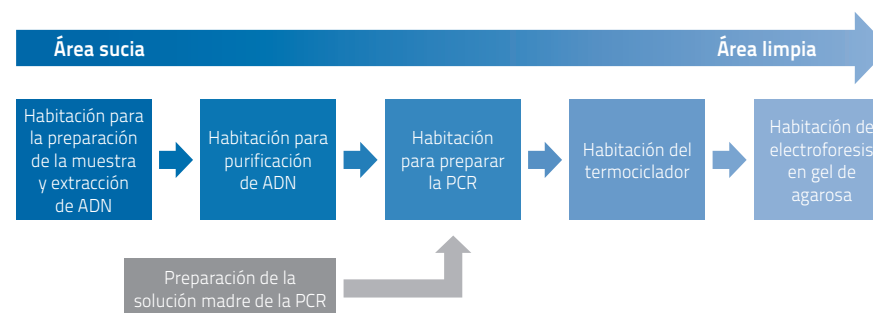


Figura 5. Áreas de un laboratorio de biología molecular y flujo de muestras

Para proteger la mezcla maestra también se recomienda que el personal que la prepare sea selectivo y no opere en el resto de las habitaciones. Si los reactivos de la PCR se contaminan se tienen que descartar y reemplazar por reactivos nuevos, lo cual puede resultar muy caro. La dedicación de personal a determinadas actividades y laboratorios no es siempre posible debido a cuestiones logísticas, limitación de personal y económicas. En este caso se recomienda como medida mínima designar batas a los laboratorios identificadas mediante código de colores. Las batas de un color pertenecen a un laboratorio y el personal debe cambiárselas cuando entra y cuando salen de dicho laboratorio.

4.4 ESTADÍSTICAS: LA IMPORTANCIA DEL MUESTREO E INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

El método analítico no se inicia en el laboratorio, sino que comienza en el lugar de muestreo, en la industria, el campo, o el supermercado. La forma en que la muestra fue tomada y la cantidad determinan si una muestra puede considerarse representativa o no. Por ejemplo, muestras pequeñas de 2 g de un producto no homogéneo no pueden considerarse representativas, por lo que los resultados analíticos obtenidos sólo son válidos para la porción de muestra analizada.

Para obtener muestras representativas, se necesita tomar cantidades más grandes durante el muestreo, para ser luego homogeneizadas, de las que se obtienen sub-muestras, que son posteriormente analizadas.

Existen algunas guías que indican como deben realizarse los muestreos. Por ejemplo para la toma de muestras de OGM, existen numerosos documentos, incluyendo los de USDA-GIPSA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos). Además existen enfoques estadísticos para determinar la probabilidad de detección (POD) de un analito o compuesto de interés. En el caso de granos y semillas se recomiendan tamaños de muestra que permiten afirmar con alta probabilidad (95% y superior) si una muestra contiene cantidades pequeñas (0,01% a 0,1%) de OGM.

Y aparte de muestreo representativo, existe también el aspecto de la incertidumbre de medición (MU), que debe tenerse en cuenta en el resultado. En metrología, la incertidumbre de la medición es un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a una cantidad medida. En otras palabras, es el rango de un resultado cuando se analiza la misma muestra varias veces, teniendo en cuenta que los resultados incluyen desviaciones del valor verdadero debido al propio método analítico.

De acuerdo con la norma ISO 17025, los informes de los análisis tienen que indicar la incertidumbre de la medición. Esto se expresa típicamente como la $X \pm Y$ [unidad], por ejemplo, 50 mg/kg \pm 10 mg/kg. En el caso del porcentaje de OGM, podría parecerse a 1.0% \pm 0.3%, lo que indica que el valor verdadero puede estar comprendido entre 0.7 - 1.3%. ¿Qué implicaciones tendría un resultado con estos valores para un laboratorio del gobierno y para un laboratorio privado?:

- a. Si este resultado lo ha producido un laboratorio gubernamental, no se podría tomar ninguna acción legal si el producto alimenticio de donde se tomó la muestra no tenía el rotulo "contiene OGM". Hay que recordar que en Europa el valor umbral de etiquetado de OGM aprobados es 0,9%. El laboratorio, que obtuvo un valor del 1% (superior al umbral de etiquetado del 0,9%), también debe tener en cuenta la incertidumbre, por lo que hay una cierta probabilidad de que el valor verdadero del contenido de OGM sea 1% - 0,3%, es decir 0,7%. El valor 0,7% está por debajo del umbral de etiquetado legal de 0,9%.
- b. Si un laboratorio privado ha obtenido el mismo resultado, 1.0% \pm 0.3%, debería recomendar al cliente que incluya en la etiqueta del producto que contiene OGM porque el valor verdadero puede ser mayor a 0.9% (umbral de etiquetado). Si esta mues-

tra es analizada por un laboratorio gubernamental de control y su incertidumbre de medición es más pequeña (por ejemplo 1% \pm 0,05%), el valor verdadero (0.95% - 1.05%) se encontraría definitivamente por encima del valor umbral (0,9%) y podría tomar acción contra la compañía productora si no rotuló OGM en el producto.

5. PROTOCOLOS DE LABORATORIO

Todos los reactivos y la composición de las soluciones de trabajo mencionados en los protocolos de laboratorio se encuentran descritos en los anexos 1-4.

5.1 HOMOGENEIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS MEDIANTE TÉCNICAS DE LA PCR

Se debe asegurar por molienda u homogeneización, que la muestra es representativa de la muestra de laboratorio. Es altamente recomendable utilizar molinillos u otros equipos que sean fáciles de limpiar.

Con el fin de minimizar el riesgo de contaminación de arrastre, todo el equipo debe limpiarse exhaustivamente antes de proceder con la homogeneización de la siguiente muestra. Ejemplos de productos de limpieza o técnicas incluyen: agentes degradantes de ADN, solución de hipoclorito, agua caliente y detergentes. Si es necesario, se debe desmontar la cubeta del molinillo para facilitar su limpieza.

5.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE INGREDIENTES Y MUESTRAS DE ALIMENTOS

Para proceder a la extracción de ADN de materia prima y alimentos procesados se recomiendan métodos basados en la CTAB. Existen diversos kits comerciales que están optimizados para la extracción de ADN de muestras de alimentos. Sin embargo, incrementan el costo del análisis.

La extracción de ADN se compone de tres fases:

1. Disrupción de paredes y membranas celulares que permiten la liberación del ADN.
2. Eliminación de proteínas y otros componentes celulares.
3. Limpieza y purificación del ADN.

5.2.1 Consideraciones previas

- Encienda el baño de agua. Compruebe que mantiene la temperatura a 65°C y contiene suficiente agua.
- Compruebe que tiene suficiente volumen de todas las soluciones.
- Mantener las soluciones de isopropanol y etanol en el congelador.
- La extracción de ADN debe llevarse a cabo en condiciones estériles. La contaminación durante la preparación de la muestra puede evitarse empleando material desechable y soluciones de descontaminación y evitando la formación de polvo.
- En paralelo a las muestras de ensayo, deben procesarse igualmente los controles positivos y negativos.

5.2.2 Procedimiento

1. Pesar 2 g de la muestra homogeneizada en 50 ml tubos de centrifuga (Tubo A).
2. Añadir 10 ml de tampón CTAB.
3. Añadir 30 µl de solución de proteinasa K y mezclar por inversión, pipeteo o agitación (vórtex).
4. Incubar y agitar durante 90 minutos a una temperatura de 65°C.
5. Centrifugar durante 5 min a 6000 g - 8000 g a temperatura ambiente.
6. Colocar 500 µl de la mezcla alcohol isoamílico-cloroformo en un vial de 2 ml (tubo B).
7. Añadir 700 µl de sobrenadante de tubo A al tubo B y mezcle bien durante 30 s.
8. Centrifugar durante 15 min a aproximadamente 14500 g a temperatura ambiente. ADN se encuentra en la fase acuosa superior en el tubo.

NOTA: Si se usan kits comerciales para purificar el ADN, usar este extracto y continuar con las instrucciones del fabricante a partir de ahora. Si no se usan kits comerciales continuar con el resto de este protocolo.

9. Añadir 500 µl de isopropanol en un vial de 1,5 ml (tubo C).
10. Añadir 500 µl de sobrenadante (fase acuosa en la parte superior) del tubo B al tubo C y mezclar cuidadosamente por inversión, pipeteo o vórtex.
11. Incubar el tubo C durante 30 min a temperatura ambiente.
12. Centrifugar durante 15 min a aproximadamente 14500 g a temperatura ambiente.
13. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante con una pipeta o vertiendo suavemente.
14. Llene el vial con 500 µl de etanol y mezcle suavemente o invierta el tubo varias veces.
15. Centrifugar durante 5 min a aproximadamente 14500 g a temperatura ambiente.
16. Retire y deseche con cuidado el sobrenadante con una pipeta o vertiendo suavemente.
17. Secar el ADN extraído con el fin de eliminar las trazas restantes de etanol, por ejemplo, invirtiendo el tubo C y secar dejando absorber con toallas de papel.
18. Disolver el extracto de ADN seco en 100 µl de solución TE.

El extracto de ADN purificado (en TE) se puede almacenar durante un corto período de tiempo (de aprox. 1 semana) a 4°C. Para plazos de almacenamiento de varios meses, el ADN se debe almacenar a -18 o -80°C.

El ADN una vez extraído de las células es bastante delicado. Para mantener su integridad evite agitaciones severas y prolongadas, así como mantenerlo a temperatura ambiente. Utilice cubetas de hielo o bloques a 4°C para mantener viales que contienen ADN cuando se preparan reacciones de PCR.

5.3 MEDICIÓN DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN

La concentración de una alícuota de ADN se puede determinar en cubetas de cuarzo por medio de espectrofotómetros UV a una longitud de onda de 260 nm.

Utilizar cubetas de cuarzo de pequeño tamaño (~250 µl). El volumen de ADN a medir dependerá de la cantidad de ADN que se espera en la muestra.

Como ejemplo: añadir en una cubeta de cuarzo 10 µl de la preparación de DNA genómico a 240 µl de agua desionizada libre nucleasas.

5.3.1 Medición de la concentración de ADN

- Realizar una medida a 260 nm
- Calcular la concentración de ADN mediante la siguiente fórmula:
- Concentración ADN ng/µl = 50 × densidad óptica (A260) × factor de dilución de la alícuota
- Valores aceptables deben comprenderse entre 1.7 y 2

5.3.2 Medición de la calidad de ADN

Grado de pureza del ADN

La evaluación de la presencia de componentes celulares como proteínas y sales no eliminadas durante el proceso de purificación de ADN se puede realizar espectrofotométricamente. Estos residuos pueden afectar negativamente el proceso de la PCR.

- Realizar dos medidas, a 260 nm y 280 nm
- Comprobar su pureza mediante la evaluación de la relación de valores a 260 nm / 280 nm. Valores aceptables de pureza deben estar comprendidos entre 1.7-2.0.

Integridad del ADN

El grado de fragmentación del ADN se evalúa visualmente en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y expuestos a luz UV (véase sección 5.6)

El ADN intacto debe observarse como una banda definida en el gel de agarosa, mientras que el ADN fragmentado presenta cierta difuminación "en escalera" (figura 6)

Una manipulación incorrecta de ADN o ADN extraído de ciertos productos procesados (ej. tratados por calor, hidrolizados, etc.) pueden ser motivos por los que el ADN se fragmenta.

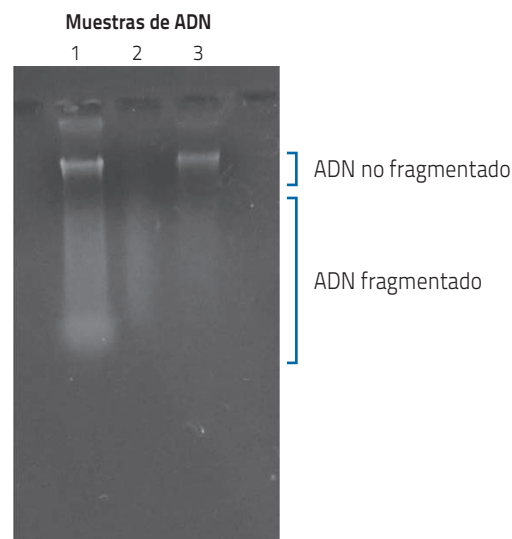


Figura 6. Visualización de la integridad de ADN en gel de agarosa

5.4 PREPARACIÓN DE LA PCR CONVENCIONAL Y PCR EN TIEMPO REAL

5.4.1 Consideraciones

Es importante llevar a cabo experimentos de control en todos los análisis de PCR. Los controles negativos están diseñados para comprobar si los reactivos de la PCR están contaminados con ADN. Los controles positivos con muestras conocidas y caracterizadas también son fundamentales para determinar no sólo que la PCR funciona sino que también proporciona información sobre la eficiencia y especificidad de la PCR.

Los siguientes controles deben ser incluidos en la PCR como reacciones independientes junto con las demás muestras a analizar:

- Control positivo: ADN puro, aislado de ingrediente que contiene el gen de interés.
- Control negativo: ADN puro, aislado de otras especies, que no contiene el gen de interés.
- Control negativo sin ADN (llamado "control de reactivos" o NTC): control negativo de la mezcla maestra, en el que se substituye el ADN por agua desionizada estéril libre de nucleasas.

5.4.2 Preparación de la mastermix (mezcla maestra) y reacciones individuales

NOTA: Si se utilizan mastermix comercial, sólo hay que añadirle a la mastermix los volúmenes adecuados de cebadores, sonda (sólo en la PCR en tiempo real) y agua. Una vez dividida la mezcla en viales añadir el ADN.

1. Determinar si se requieren reacciones de 25 (PCR convencional o PCR en tiempo real) o 50 µl (PCR-RFLP).
2. Calcular los volúmenes necesarios de los reactivos de la PCR (excepto ADN) para el número de reacciones totales (muestras y controles), más una reacción extra por cada 10 muestras.
3. Añadir los reactivos a un vial de 1.5 ml empezando por los componentes de mayor volumen: Agua, Tampón de PCR, MgCl₂, dNTPs, Cebadores, sonda (sólo en la PCR en tiempo real) y DNA Taq Polimerasa.
4. Mezcle suavemente la mastermix por pipeteado y centrifugar breve y suavemente.
5. Para preparar las reacciones individuales dividir la mezcla maestra en alícuotas de 0,2 ml en tubos de reacción de PCR.
6. Añadir la solución de ADN de las muestras y controles correspondientes a las alícuotas anteriores.
7. Agitar suavemente y centrifugar breve y suavemente.
8. Añadir una gota de aceite mineral si el termociclador (PCR convencional) no dispone de tapa con calentador.
9. Coloque los tubos de reacción de PCR en el termociclador.

5.4.3 Programa de PCR

Utilizar las condiciones específicas (desnaturalización, alineamiento, extensión y número de ciclos) de PCR o PCR en tiempo real específicas para elemento diana.

Existen numerosos protocolos para la detección de OGM, alérgenos y especies cárnicas. Estos incluyen documentos oficiales, estándares y publicaciones científicas. Los siguientes son algunos ejemplos de referencias que citan condiciones de PCR:

- **OGM:** EURL-GMFF y ENGL (2011); Querci, M., Jermini, M, y Van den Eede, G. (2007)
- **Alérgenos:** Métodos oficiales de análisis alemanes: L 08.00-59 2013-01, L 44.00-11 2013-01
- **Identificación de especies cárnicas animales:** Alaraidh (2008); Huang et al. (2011); Martín et al (2007); Meyer et al (1995); Myers et al (2001); Maede (2006); Popping & Hird (2003)

5.5 PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA PARA VISUALIZAR PRODUCTOS DE LA PCR

Los geles de agarosa se utilizan para las siguientes situaciones:

- Determinar la integridad del ADN
- Visualizar los productos de la PCR convencional
- Visualizar los fragmentos resultantes de la digestión de productos de la PCR con enzimas de restricción (PCR-RFLP)

5.5.1 Preparación del gel

- Sellar los bordes del molde plástico limpio y seco con cinta adhesiva. Colocar el peine adecuado de modo que se formen pocillos al añadir la solución de agarosa.
- Diluir tampón de TBE 10x y preparar la cantidad adecuada de tampón de TBE 0,5X para llenar la cubeta de electroforesis y preparar el gel (50 ml TBE 10X + 950 ml agua destilada).
- Añadir la cantidad adecuada de agarosa a una cantidad apropiada de tampón TBE 0,5X (tabla 3) en un matraz de Erlenmeyer (normalmente 150 ml de solución de gel para un molde de 15 x 15 cm y 100 ml de gel para un molde de 15 x 10 cm).

Gel Agarosa (%)	Rango de separación (bp)
0,7	800 - 12000
1,0	400 - 8000
1,5	200 - 3000
2,0	100 - 2000
3,0	25 -1000

Tabla 3. Determinación de la concentración de agarosa en función del tamaño de los fragmentos de ADN

- Calentar en un microondas o a baño maría hasta que se disuelva la agarosa (comprobar el volumen de la solución tras haberla calentado).
- Enfriar la mezcla a 50 - 60°C y añadir bromuro de etidio** (de una solución madre de 10 mg/ml) hasta lograr una concentración final de 0,5 µg/ml y mezclar bien (5 µl cada 100 ml gel).
- Verter la solución en el molde y dejar gelificar. El grosor del gel deber ser de aprox. 5 mm.
- Retirar el peine del gel cuidadosamente y también la cinta adhesiva. Colocar el gel en la cubeta de electroforesis.
- Añadir tampón de TBE 0,5X (que contiene 0.5 µl/ml de bromuro de etidio**) a la unidad de electroforesis de modo que el gel quede cubierto por una capa de aproximadamente 2-5 mm.

**NOTA: Alternativa al uso del bromuro de etidio en gel y búfer: Después de finalizar la carrera sumergir el gel en una solución de bromuro de etidio de 0,5 µg/ml en agua durante 30 min.

5.5.2 Preparación de las muestras y marcadores. Proceso de electroforesis

Preparar las muestras de acuerdo a la tabla 4.

	ADN genómico	Muestra (PCR)	Marcador *
Agua (µl)	3	-	
Tampón de carga (µl)	2	2	
Muestra (µl)	5	8	

* Mirar instrucciones del producto

Tabla 4. Preparación de muestras para ser cargadas en gel de agarosa

- Cargar 10 µl de cada muestra en pocillos consecutivos y el ADN marcador adecuado (50 pb para PCR-RFLP o 100 pb para PCR convencional) en las calles primera y última.
- Cerrar la tapa de la cubeta del gel y conectar los cables eléctricos para que el ADN migre hacia el ánodo (clavijas rojas) y aplicar una tensión de 5-10 V/cm. Véase tabla 5.

Tamaño ADN	Voltaje	Búfer
< 1 kb	5-10 V/cm	TBE
1-5 kb	4-10 V/cm	TBE o TAE
> 5 kb	1-3 V/cm	TBE o TAE

Tabla 5. Voltaje recomendado para desarrollar gel de agarosa en función del tamaño de los fragmentos de ADN esperados y el búfer utilizado.

- Hacer la electroforesis monitoreando el frente de azul de bromofenol (~40-60 minutos para un gel de agarosa 1-2%).
- Colocar el gel en un transiluminador UV y fotografiarlo.
- Tirar el gel en el recipiente para residuos sólidos destinado al bromuro de etidio previsto a tal fin.

IMPORTANTE:

- El bromuro de etidio es altamente mutagénico. Evitar el contacto con este químico mediante el uso de guantes. Eliminar residuos de bromuro de etidio de acuerdo a las normativas locales.
- Usar gafas de protección UV o cubrir la caja de luz con el escudo de protección UV cuando la luz UV está encendida. La UV puede causar cáncer de piel.

5.6 PREPARACIÓN DE LA PCR-RFLP

Para proceder a la digestión de los fragmentos de la PCR se recomienda leer las instrucciones de cada enzima de restricción utilizada.

5.6.1 Preparación de la reacción de RFLP

Por lo general, la digestión de fragmentos de la PCR se prepara de la siguiente manera:

- 10 µl del producto de PCR (ej. PCR específica del citocromo b)
- 1 µl de la enzima de restricción (es decir, 5-10 unidades)
- 2 µl de solución tampón suministrada con la enzima.
- Agua destilada hasta completar 20 µl.

Incubar durante 3 horas a 37°C

Los fragmentos de restricción se separaran en gel de agarosa 2% en tampón TBE 0.5X usando un estándar de 50 pb (figura 7)



Figura 7. PCR (citocromo b) – RFLP con enzimas de restricción (Hinf I, Hae III y Alu I) de muestras de carnes y pescado.

6. FUENTES ADICIONALES DE INFORMACIÓN

- Página sobre seguridad alimentaria de la Comisión Europea, Dirección General de Salud y Protección de los Consumidores
http://ec.europa.eu/food/food/index_es.htm
- Página web del Joint Research Center (Comisión Europea) dedicada a OGM
http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_activities/gmo/gmo_capacity_building/intro#
- Base de datos de legislación y publicaciones de la Unión Europea (EUR-Lex)
<http://eur-lex.europa.eu/homepage.html?locale=es>
- Página web de la European Food Safety Authority (EFSA)
<http://www.efsa.europa.eu/>
- Página web de "Rapid Alert System for Food and Feed"
http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm
- Base de datos de la Comisión Europea sobre OGM aprobados:
http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
- GMO Compass: http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm
- Métodos oficiales de análisis (Alemania): <http://www.methodensammlung-bvl.de/>
- Comité Europeo de Normalización (CEN): <https://www.cen.eu/Pages/default.aspx>
- Codex Alimentarius: <http://www.codexalimentarius.org/>

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La autenticidad de los alimentos y la seguridad alimentaria son temas altamente prioritarios para consumidores y reguladores. El cuaderno presta especial atención a estrategias analíticas de organismos modificados genéticamente, la detección de alérgenos y autenticidad de carne (identificación de especies cárnicas). Además no sólo se describen las técnicas analíticas más comunes para cada caso, inmunológicas y moleculares (ELISA, PCR, RFLP), sino que también se proporcionan consejos para reducir la carga de trabajo y el costo por análisis sin afectar la fiabilidad analítica. Este aspecto es importante especialmente para aquellos laboratorios con recursos de infraestructura y económicos limitados. El manual también analiza los antecedentes y la historia de esos temas de manera que permiten a los lectores anticipar problemas futuros y poner en práctica medidas para controlar el cumplimiento de la legislación en Argentina y para apoyar a la industria exportadora de manera que sus productos sean aceptados sin problemas en los países de la Comunidad Europea. Esto, en última instancia beneficiará a los consumidores a través de fortalecer la confianza en los productos argentinos y como consecuencia fomentar la economía, ya que la confianza por lo general conduce a un aumento de los negocios.

Para seguir impulsando esta iniciativa hacia adelante, se recomienda consultar con frecuencia las páginas de la Comisión Europea, en particular las del Centro de Investigación JRC de Italia para la detección de nuevos OGM.

También se recomienda continuar y actualizar este tipo de formación con regularidad y hacer participar a los nuevos empleados de los laboratorios del gobierno, especialmente laboratorios de control.

Más allá de los aspectos puramente analíticos, y para fortalecer a la industria, también se recomienda capacitar a los operadores de empresas de modo que puedan:

- reconocer actividades fraudulentas
- implementar las buenas prácticas de manufacturas (BPM) y planes de control de alérgenos para evitar la presencia inadvertida de alérgenos en sus productos
- implementar las prácticas de trazabilidad de OGM así como los requisitos de exportación, especialmente a aquellos países con legislación sobre etiquetado de OGM

Además, también se pueden llevar a cabo una serie de capacitaciones sobre la gestión de problemas asociados con los OGM, alérgenos y fraude adaptadas a los gerentes de control de calidad de pequeñas y medianas empresas.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1 – LISTAS DE REACTIVOS Y EQUIPOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN (MÉTODO CTAB)

8.1.1 Equipos y Materiales

- Homogeneizador (molinillos, mortero, hoja de bisturí estéril, etc.)
- Espátulas
- Probetas
- Balanza capaz de efectuar mediciones de 0,01 g
- Baño de agua caliente o bloque calentador
- Centrífuga para tubos de 50 ml (capaz de 8000 g)
- Microcentrífuga para tubos 1,5 y 2 ml (capaz de 14500 g)
- Micropipetas y puntas estériles
- Agitador de tubos o Vórtex
- Tubos para microcentrífuga de 1,5 o 2 ml
- Bandejas de pesar o equivalente
- Soporte para tubos de microcentrífuga
- Optativo: Papel para eliminar restos de alcohol.

IMPORTANTE: Antes de utilizar todo el instrumental hay que esterilizarlo y eliminar todos los residuos de ADN. Para evitar la contaminación, se recomienda utilizar puntas de pipeta con barrera protectora contra aerosoles.

8.1.2 Reactivos de extracción de ADN

- Cloroformo, CAS 66-67-3.
- Etanol, 70%, CAS 64-17-5.
- Na₂EDTA (Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético), CAS 6381-92-6.
- CTAB (bromuro de cetil-trimetil amonio), CAS 57-09-0.
- Ácido clorhídrico, = 37%, CAS 7647-01-0.
- Alcohol isoamílico, CAS 123-51-3.
- Isopropanol, CAS 67-63-0.
- Proteinasa K, EC 3.4.21.64.
- Cloruro de sodio, CAS 7647-14-5.
- Hidróxido de sodio, CAS 1310-73-2.
- TRIS (Tris (hidroximetil aminometano), CAS 7-86-1.

IMPORTANTE: Todos los productos químicos han de ser de calidad de biología molecular. El agua desionizada y los tampones han de esterilizarse en autoclave antes de su utilización. Ningún producto químico debe contener ADN ni desoxirribonucleasas.

8.1.3 Soluciones necesarias para preparar las soluciones de trabajo

1 M Tris HCl pH 8.0

- 121.1 g Tris
- Disolver en aproximadamente 700 ml de H₂O
- Ajustar el pH a 8.0 mediante la adición de HCl concentrado (necesitará aprox. 50 ml).
- Completar 1 L con ddH₂O.

0.5 M EDTA

- 186.12 g EDTA
- Añadir 700 ml H₂O
- 16-18 g of NaOH pellets
- Ajustar el pH a 8.0 mediante la adición de unos pellets más, EDTA no se disuelve hasta que el pH se acerca a 8. EDTA se disuelve muy despacio, puede llevar horas.
- Completar 1 L con ddH₂O.

5 M NaCl

- 292.2 g of NaCl
- 700 ml H₂O

Disolver (no añada todo el NaCl de golpe, porque no se disuelve todo) y complete el 1 L.

8.1.4 Soluciones de trabajo

Mezcla alcohol isoamílico – cloroformo (mezclas comercialmente disponibles)

- Mezclar 24 partes cloroformo, con 1 parte de alcohol isoamílico (24v+1v).

Solución tampón de extracción CTAB (1 Litro) [CTAB 20 g/L; NaCl 1.4 mol/L; Tris 0.1 mol/L; Na₂EDTA 0.02 mol/L]:

- 100 ml 1 M Tris HCl pH 8.0
- 280 ml 5 M NaCl
- 40 ml of 0.5 M EDTA
- 20 g of CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)
- El pH debe ser ajustado a 8,0 mediante la adición de ácido clorhídrico.
- Llevar a volumen final de 1 l con ddH₂O
- Autoclavar

Solución de proteinasa K (20 mg/ml)

- Añadir 5 ml de agua desionizada estéril a 100 mg de proteinasa K
- Mezclar bien por inversión
- Preparar alícuotas (ej. 500 µl)

NOTAS:

- Después de la reconstitución, conservar en forma de alícuotas a -20°C.
- No someta la enzima a autoclavado.
- Guardar inmediatamente a -20°C después de su uso.

Solución tampón TE [Tris 0,01 mol/L; Na₂EDTA 0.001 mol/L]:

- 10 ml 1 M Tris HCl pH 8.0
- 2 ml 0.5 M EDTA
- Llevar a volumen final de 1 L con ddH₂O
- El pH deberá ser ajustado a 8,0 mediante la adición de solución de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.
- Dividir el litro de TE en distintas envases más pequeños, por ejemplo en botellas de 200 o 500 ml.
- Autoclavar

IMPORTANTE:

- Encienda el baño de agua. Compruebe que mantiene la temperatura a 65°C y contiene suficiente agua.
- Compruebe que tiene suficiente de todas las soluciones.
- Mantener las soluciones de isopropanol y etanol en el congelador.
- La extracción de ADN debe llevarse a cabo en condiciones estériles. La contaminación durante la preparación de la muestra puede evitarse empleando material desechable, soluciones de descontaminación y evitando la formación de polvo

8.2 ANEXO 2 – LISTA DE REACTIVOS Y EQUIPOS PARA LA PCR Y PCR EN TIEMPO REAL

8.2.1 Equipos

- Micropipetas y puntas
- Termociclador
- Microcentrífuga
- Mezclador Vórtex
- Gradilla para tubos de reacción
- Tubos de reacción de 0,2 ml PCR
- 1,5 ml tubos de microcentrífuga
- Laboratorio estéril independiente equipado con tubos UV

OBSERVACIÓN:

- Todo el equipo debe estar libre de ADN y en lo posible, esterilizados antes de su uso.
- Con el fin de evitar la contaminación, deben utilizarse puntas de pipeta de barrera protegidas para evitar la formación de aerosoles.

8.2.2 Reactivos

- dATP
- dCTP
- dGTP
- dTTP
- Tampón 10x PCR (proporcionados por el mismo proveedor de la ADN Taq polimerasa)
- MgCl₂
- Taq ADN polimerasa
- Cebadores (primers)
- Sondas (probes). Sólo es necesaria para la PCR en tiempo real
- El aceite mineral (necesario en caso de que se utilice un termociclador sin tapa caliente)
- Agua estéril libre de nucleasas

NOTA: Las mastermixes comerciales contienen la ADN polimerasa, dNTPs, tampón de la PCR y MgCl₂.

8.2.3 Preparación de soluciones

Solución madre 4 mM dNTP

- dNTPs pueden ser suministrados en las preparadas conteniendo iguales concentraciones de dATP, dCTP, dGTP, dTTP - o separados en concentraciones individuales. Si se utilizan las preparaciones individuales, disolver cada dNTP en agua desionizada estéril, contar con una solución de stock dNTP 4 mM final.
- Dividir en alícuotas y almacenar a -20°C. dNTPs son estables durante varios meses.

Solución de cebadores 20 µM y sondas 10 µM

Los oligonucleótidos cebadores se suministran generalmente en forma liofilizada y se deben diluir a una concentración final de 20 µM.

Preparar solución de cebadores 100 µM de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

- 1 µM = 1 pmol / µl de modo que 20 µM = 20 pmol / µl
- "n" nmol Primer + 10x"n" µl de TE 0.1X = 100 pmol / µl = 100 µM

Si mis primers tienen 0.05 µmol = 50 nmol, entonces:

50 nmol Primer + 500 µl de TE búfer (1:10) = 100 pmol / µl = 100 µM

Preparar alícuotas de 100 µl para almacenamiento por largos periodos a -20°C

Cebadores 20 µM:

Añadir 400 µl de agua estéril a 100 µl de la solución de primers (100 µM)

Sondas 10 µM:

Añadir 450 µl de agua estéril a 50 µl de la solución de sonda (100 µM)

Dividir en pequeñas alícuotas y almacenar a -20°C. Las alícuotas almacenadas a -20°C son estables durante al menos 6 meses. Los cebadores liofilizados son estables a -20°C durante un máximo de tres años.

Tampón PCR 10X

- Normalmente, el tampón de PCR 10X, que contiene KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM (pH 9,0 a 25°C) y 1% de Triton X-100 se proporciona junto con la ADN polimerasa Taq y está listo para usar. El tampón debe ser mezclado y centrifugado brevemente antes de cada uso.
- Las alícuotas se almacenan a -20°C y son estables durante varios meses.

Solución de MgCl₂ 25 mM

- La solución de MgCl₂ "grado PCR" se suministra generalmente junto con la ADN Polimerasa Taq y está listo para usar. La solución debe mezclarse (vórtex) antes de cada uso y se centrifuga brevemente (para eliminar el gradiente de concentración que se puede formar en el caso de una conservación prolongada).
- Almacenar a -20°C.

8.3 ANEXO 3 - REACTIVOS NECESARIOS PARA LA PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

8.3.1 Equipos y materiales

- Matraces pequeños (250 ml)
- Pipetas de vidrio de 5 ml.
- Probetas (50 ml or 100 ml, 1L)
- Micropipetas y puntas desechables para las mismas.
- Tubos eppendorf de 0.2 ml.
- Balanza
- Centrifuga Eppendorf de sobremesa.
- Microondas o mechero de gas.
- Equipo de electroforesis (cubeta, soporte/molde, peine, fuente de alimentación).
- Transiluminador de luz UV.
- Equipo de tratamiento de imagen y fotografía.

8.3.2 Reactivos

- Agua desionizada
- Agarosa adecuada para electroforesis de ADN
- Tris [hidroximetil] aminometano (Tris)
- Ácido bórico
- Na₂EDTA
- Bromuro de etidio
- Sacarosa
- Azul de bromofenol o Cianol de xileno FF
- ADN marcadores:
- Lambda ADN EcoRI/HindIII digerido (u otros marcadores adecuados similares)
- Marcador de peso molecular de ADN de 100 pb (PCR) o 50 pb (PCR-RFLP).

8.3.3 Preparación de soluciones de trabajo

Tampón de TBE 10x (1 litro)

- Tris [hidroximetil] aminometano (Tris) 108 g
- Ácido bórico 55 g
- Na₂EDTA 7,44 g o 40 ml of 0.5 M EDTA (pH 8)

Mezclar el reactivo con agua desionizada para obtener una solución de un litro con un pH de 8,3.

Conservar a temperatura ambiente.

Tampón de carga 6x (10 ml)

- Azul de bromofenol o Cianol de xileno FF (0.02%) 0,025 g
- Sacarosa (40%) 4 g
- Agua desionizada hasta completar 10 ml de solución.

Mezclar la solución y conservar a 4°C.

Bromuro de Etidio 10 mg/ml

Guardar a 4°C protegido de la luz (en envase oscuro y/o envuelto con papel de aluminio)

8.4 ANEXO 4 – LISTA DE REACTIVOS Y EQUIPOS NECESARIOS PARA LLEVAR A CABO LA DIGESTIÓN DE FRAGMENTOS DE PCR CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (RFLP)

8.4.1 Reactivos

Hay numerosas enzimas disponibles comercialmente. Las siguientes son sólo ejemplos.

- AluI (10 U/ μ l) + su buffer correspondiente
- Hinf (10 U/ μ l) + su buffer correspondiente
- HaeIII (10 U/ μ l) + su buffer correspondiente
- Agua estéril desionizada libre de nucleasas

8.4.2 Materiales

- Baño de agua o bloque calentador de tubos 0.2 ml capaz de mantener temperatura constante de 37°C durante varias horas
- Tubos de 0.2 ml

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alaraidh, I.A. (2008) Improved DNA extraction method for porcine contaminants, detection in imported meat to the Saudi market. Saudi Journal of Biological Sciences 15(2), 225-229.
- L 08.00-59 2013-01 Nachweis und Quantifizierung von Senf (*Sinapis alba*) sowie Soja (*Glycine max*) in Brühwürsten mittels real-time PCR (Método oficial alemán)
- L 44.00-11 2013-01 Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz aus Erdnuss (*Arachis hypogaea*) in Schokolade mittels real-time PCR (Método oficial alemán)
- EAACI - European Academy of Allergy and Clinical Immunology (2013) Declaración Pública sobre la Alergia a los Alimentos y la Anafilaxia <http://www.seaic.org/wp-content/plugins/download-monitor/download.php?id=Declaracion-Publica-EAACI.pdf> (web visitada en 14.10.2014)
- ENGL (2009) Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/Min_Perf_Requirements_Analytical_methods.pdf (web visitada por última vez en 16.10.2014)
- ENGL working group (2011) Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. Publications Office of the European Union. ISBN 978-92-79-19925-7 <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/doc/ENGL%20MV%20WG%20Report%20July%202011.pdf> (web visitada por última vez en 16.10.2014)
- EURL-GMFF y ENGL (2011) Compendium of reference methods for GMO analysis. JRC Reference Reports. EUR 24526 EN <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/> (web visitada por última vez en 16.10.2014)
- Huang, K.M., Liu, S.M., Huang, Y.W. et al. (2011) Food Poisoning Caused by *Sunfish Masturus lanceolatus* in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis 19(2), 191-196.
- Maede, D. (2006) A strategy for molecular species detection in meat and meat products by PCR-RFLP and DNA sequencing using mitochondrial and chromosomal genetic sequences. Eur. Food Res. Technol. 224(2), 209-217
- Martín, I., García, T., Fajardo, V. et al. (2007) Detection of chicken, turkey, duck, and goose tissues in feedstuffs using species-specific polymerase chain reaction. Journal of Animal Science 85, 452-458
- Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J. & Candrian, U. (1995) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food. Journal of AOAC International 78(6), 1542-1551
- Myers, M.J., Friedman, S.I., Farrell, D.E. et al. (2001) Validation of a polymerase chain reaction method for the detection of rendered bovine-derived materials in feedstuff. Journal of Food Protection 64(4).

- Popping, B. & Hird, H. (2003) Real time analysis of PCR - based DNA methods for the limit of detection, sensitivity and specificity. Food Standards Agency, Report Q01033.
- Popping, B., et al., (2008) Real time authenticity analysis of premium price perfumes and frauds, AOAC Int'l Symposium, Dallas, Texas, USA, Poster presentation.
- Popping, B., Díaz-Amigo, C., y Hoenicke, K. (2010) Molecular Biological and Immunological Techniques and Applications for Food Chemists. Wiley. ISBN: 978-0-470-06809-0
- Querci, M., Jermini, M, y Van den Eede, G. (2007) Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Manual del Principiante. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. 978-92-79-04831-9
- Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria
- Reglamento (CE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.
- Reglamento (CE) No 41/2009 de la Comisión de 20 de enero de 2009 sobre la composición y etiquetado de los productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten
- Reglamento (CE) n° 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente
- Reglamento (CE) n° 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos
- Reglamento (UE) No 619/2011 de la Comisión de 24 de junio de 2011 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos y de la presencia en ellos de material modificado genéticamente cuyo procedimiento de autorización esté pendiente o cuya autorización haya caducado
- Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules
- USDA-GIPSA (2013) Sampling. http://www.gipsa.usda.gov/fgis/insp_weigh/sampling.html (web visitada por última vez en 16.10.2014)
- Wang, J. & Liu, A.H. (2011) Food Allergies and asthma. Current Opinions on Allergy and Clinical Immunology 11(3): 249–254 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155248/pdf/nihms313352.pdf> (web visitada en 14.10.2014)



PROYECTO **MEJORA DE LAS ECONOMÍAS
REGIONALES Y DESARROLLO LOCAL**

—

DETECCIÓN
**DE ALÉRGENOS,
ORGANISMOS
GENÉTICAMENTE
MODIFICADOS (OGM)
E IDENTIFICACIÓN
DE ESPECIES EN ALIMENTOS
POR BIOLOGÍA MOLECULAR**



INTI



Unión Europea

Instituto Nacional de Tecnología Industrial
Gerencia de Cooperación Económica e Institucional
Avenida General Paz 5445 - Edificio 2 oficina 212
Teléfono (54 11) 4724 6253 | 6490
Fax (54 11) 4752 5919
www.ue-inti.gob.ar



Presidencia de la Nación

INDUSTRIA