



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

Depto. de Ing. Química y Bioquímica

TECNOLÓGICO NACIONAL DE OAXACA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
BIOQUÍMICA

TESIS

**DETECCIÓN DE *SALMONELLA SPP* Y *LISTERIA
MONOCYTOGENES* EN PRODUCTOS CÁRNICOS
MEDIANTE TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA:

YANITZA SOLEDAD BOHÓRQUEZ MENDOZA

ASESOR:

DR. LUIS JAVIER TOLEDO FLORES

COMISIÓN REVISORA:

**M.C. MINERVA DONAJÍ LÓPEZ MÉNDEZ
DRA. MARÍA DEL JESÚS RAMÍREZ ALTAMIRANO
M. EN D. FLOR DE BELEN PÉREZ CHÁVEZ**

OAXACA DE JUÁREZ, OAXACA

JUNIO 2024

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se lo dedico a mis padres, familia, amigos, profesores y a mi compañero de vida ROMA que me han apoyado, guiado y motivado durante este camino. Principalmente está dedicado a mi abuelita Mamá Nela, a mi mami Yadira, mis tías Soledad y Marisela, que han sido mi mayor apoyo durante mi vida y principalmente en mi camino profesional, han sabido guiarme y con sus palabras, amor y comprensión, he podido concluir y haber logrado esta meta. A mis hijos perrunos Maru, Fisher y Milo que se desvelaban conmigo haciendo tareas y estudiando, fueron parte de mi motivación día a día. A ti ROMA, gracias por siempre darme palabras de aliento en cada momento, por impulsarme a seguir y no darme por vencida, por siempre ayudarme a buscar soluciones positivas, gracias de todo corazón por ser parte de este logro, te amo. Te dedico éste logro, hermano, Marcos Bohórquez, porque sé que en donde quieras que estás, me cuidas, me guías y sobre todo, te sienes orgulloso de mí, como siempre me lo decías, te amo y un día nos volveremos a encontrar. Gracias papi, por esos desvelos, por esas malas comidas, por poner en riesgo tu vida, para poder brindarme estudios, hoy, éste es el fruto de tu esfuerzo, aquí se ve reflejado cada sacrificio que haz hecho para mi bienestar. Le agradezco al Dr. Luis Javier Toledo Flores y a la Dra. Edith Alheli Bernabé Pérez que me brindaron la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, de vivir esta experiencia a nivel profesional y a nivel personal. Este logro es para ti Mamá Nela, que siempre serás el principal pilar de mi vida que me acompañe a cada lugar y en cada logro de mi vida, este es el fruto de tu cariño.

Mami Yadira, este es el fruto de tu tiempo, de tu dedicación en cuerpo y alma hacia a mí,
gracias por siempre estar, por nunca soltarme, siempre las amaré profundamente y por fin
puedo decir....

¡LO LOGRAMOS, MAMITAS!

RESUMEN

Más del 90% de los casos confirmados y muertes por enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) han sido atribuidos a bacterias. La presencia de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en carnes, lácteos y huevos las convierten en microorganismos responsables de gran parte de estas ETAs. El objetivo de la investigación fue detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* mediante técnicas de biotecnología molecular en carnes frescas. Se aplicaron tres métodos para la detección de estos microorganismos: método microbiológico convencional de acuerdo a las NOMs, kit comercial (RapidCheck®, Romer Labs) y método molecular mediante PCR. Se analizaron muestras de carne de cerdo, res, pollo, pescado y camarón adquiridas en el mercado principal de la ciudad de Oaxaca. La cuenta de organismos mesófilos aerobios dio valores de hasta 51,000 UFC/g en las muestras de las carnes frescas. El método de kit comercial para *Salmonella spp* mostró resultados positivos para todas las muestras, a excepción de la muestra de pescado; y resultados negativos en todas las muestras para la detección de *Listeria monocytogenes*. El método molecular de extracción de ADN directo mediante métodos enzimáticos presentó valores de pureza y calidad dentro del rango esperado. La presencia de los microorganismos de interés se realizó mediante PCR, cuyo análisis en geles de agarosa mostró resultados positivos para los productos cárnicos. El método de extracción directa ofreció la ventaja de evitar cultivos primarios y obtener resultados altamente confiables en un periodo de 4 horas. La implementación de este método redujo el tiempo de análisis de 5 días por el método microbiológico y 2 días mediante el uso del Kit comercial, a 4 horas por el método molecular.

INDICE

INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO	10
1.1 PRODUCTOS CÁRNICOS	10
1.1.1 GANADO VACUNO	11
1.1.2 GANADO OVINO.....	13
1.1.3 GANADO CAPRINO	14
1.1.4 GANADO PORCINO	15
1.1.5 AVES	16
1.2 CALIDAD SANITARIA DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS.....	19
1.2.1 NORMATIVIDAD DE PRODUCTOS CÁRNICOS	24
1.2.2 MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS	57
1.2.3 ESCHERICHIA COLI	58
1.2.4 LISTERIA MONOCYTOGENES	59
1.2.5 SALMONELLA SPP	60
1.3 TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS.....	61
1.3.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO	62
1.3.2 REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA.....	76
1.3.3 IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEOTIDOS POR ELECTROFORESIS	77
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA.....	80
RESULTADOS	88
CONCLUSIONES	90
REFERENCIAS	91

INDICE DE ILUSTRACIONES Y TABLAS

Ilustración 1. Representación simplificada de las membranas celulares (V. & Echeverria, 2014).....	68
Ilustración 2. Solubilización de los lípidos. (V. & Echeverria, 2014).....	68
Ilustración 3. Rotura de la membrana celular y extracción del ADN genómico. (V. & Echeverria, 2014).....	69
Ilustración 4. Representación esquemática de la transmisión de la luz. (Chan, 2002).....	72
Ilustración 5. Reacción en cadena de polimerasa	76
Ilustración 6. IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEOTIDOS POR ELECTROFORESIS	78
Ilustración 7 Análisis electroforético de productos de PCR para la identificación de microorganismos en muestras microorganismos en muestras microbiológicas. MP)	
Marcador de peso molecular 100 pb NEB, C1: E. coli, C2: L. monocytógenes, C3: S. aureus y Ca: Salmonella spp.	89
Tabla 1. Límites máximos	39
Tabla 2. Límites máximos para los productos objeto de esta Norma (mg/kg).....	41
Tabla 3. Límites máximos (NOM-213-SSA1-2018, 2019).....	42
Tabla 4. Valores de la absorbancia de ADN de timo de ternera muy purificado, en tampón TNE 1x.	75
Tabla 5 Iniciador utilizado para evaluar la población bacteriana. Fuente: Chiang y col., 2012.	81
Tabla 6 Componentes de reacción de PCR	85
Tabla 7 Condiciones de reacción de ciclado establecida para evaluar los iniciadores.....	86
Tabla 8 Resultados de Salmonella y Listeria en técnica molecular, método tradicional y kit	88

INTRODUCCIÓN

La comercialización de alimentos es un fenómeno de gran impacto social, cultural, económico y sanitario. En nuestro país, esta actividad es muy común en las ciudades principales, ya que ofrecen ciertas ventajas como: fácil acceso, bajo costo, variedad de alimentos y rapidez en su servicio; lo cual los convierte en la alternativa que más se adapta al ritmo de vida de los habitantes. La presencia de microorganismos está reglamentada por los organismos de salud de cada país; Cuando algunos de ellos, principalmente patógeno supera las cantidades indicadas por la norma sanitaria se convierte en un potencial transmisor de enfermedades producidas por alimentos significando así un riesgo para la salud de los consumidores. (D'Aoust, 2007)

Las especies *Salmonella entérica*, *Salmonella tiphymurium* y *Listeria Monocytogenes* son parte de los 14 patógenos principales transmitidos por alimentos; sus principales fuentes como carnes lácteos y huevos la convierten en 1 de los géneros de microorganismos patógenos más comunes en los alimentos. (D'Aoust, 2007)

El desarrollo de técnicas moleculares de detección y diagnóstico ha permitido la determinación de ácidos nucleicos y secuencias específicas de material genético de organismos de interés por lo que los resultados obtenidos mediante las mismas son más específicos sensibles y rápidos que los métodos tradicionales empleados. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en tiempo real se basa en la amplificación in vitro de ADN con la ventaja de llevar a cabo a partir de un mismo vial la detección y cuantificación del ADN de interés junto con un análisis de los factores relacionados al sistema de amplificación por PCR. (D'Aoust, 2007)

Recuperación de estas herramientas moleculares tanto para la identificación de patógenos como la cuantificación de su material genético centrará las bases para posteriores proyectos de

YANITZA SOLEDAD BOHÓRQUEZ MENDOZA TESIS PROFESIONAL

investigación relacionados con el tema el aporte de este estudio sobre las condiciones de inocuidad de los alimentos y el ambiente sanitario de los establecimientos podrán contribuir con el mejoramiento de la calidad de vida de los consumidores y la regularización de los procesos de control de los organismos de salud. (Albo, 2011)

En la actualidad el género *Salmonella spp* y *Listeria monocytógenes*. Representa uno de los patógenos alimentarios más importantes a nivel mundial, causante de enfermedades gastroentéricas en humanos y en animales. Una de las principales fuentes de contagio con bacterias patógenas es el consumo de alimentos contaminados, entre lo que se pueden mencionar productos cárnicos, avícolas, productos lácteos, huevo y vegetales. Se ha demostrado que los alimentos se contaminan durante su procedimiento o, por el empleo de materia prima contaminada pues es el género *Salmonella* constituye gran parte de la flora normal de las aves, cerdo y ganado. (JE, 2004)

Las enfermedades transmitidas por los alimentos continúan siendo una gran amenaza a la salud pública en todo el mundo, y son una causa importante de mortalidad. Aunque la mayoría son leves y se asocian a síntomas gastrointestinales agudos, tales como la diarrea y vómitos; en algunas ocasiones las enfermedades por alimentos pueden resultar mucho más severas y peligrosas para la vida del consumidor especialmente en niños. (JE, 2004)

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una técnica de biotecnología molecular para la detección de *Salmonella ssp* y *Listeria Monocytogenes* en productos cárnicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer el ADN de células presentes en productos cárnicos mediante procedimientos enzimáticos.
2. Amplificar el gene característico de *Salmonella ssp* y *Listeria Monocytogenes* por medio de la reacción en cadena polimerasa.
3. Identificar la presencia del gene característico de *Salmonella ssp* y *Listeria Monocytogenes* por electroforesis.

CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

1.1 PRODUCTOS CÁRNICOS

La carne es el producto pecuario de mayor valor. Posee proteínas y aminoácidos, minerales, grasas y ácidos grasos, vitaminas y otros componentes bioactivos, así como pequeñas cantidades de carbohidratos. Desde el punto de vista nutricional, la importancia de la carne deriva de sus proteínas de alta calidad, que contienen todos los aminoácidos esenciales, así como de sus minerales y vitaminas de elevada biodisponibilidad. (Arenas, y otros, 2009)

La transformación de la carne se ha realizado desde tiempos remotos con el fin primordial de conservarla por periodos largos de tiempo. Convertir la carne en embutidos, ayuda sin duda a la conservación, pero fundamentalmente produce en la carne un sabor exquisito. Los embutidos abarcan la preparación de una gran cantidad de productos como jamón, chorizo y longaniza, entre otros. (Albo, 2011)

Según el método, el sabor de la carne mediante el empleo de especias, el modo de presentación, el grado de salazón, curación, desecación y ahumado.

Una clasificación de los productos cárnicos es la siguiente:

- Embutidos crudos: chorizos y longanizas.
- Embutidos escaldados: salchichas.
- Embutidos cocidos: queso de puerco y morcilla o rellena.
- Carnes curadas: jamón, tocino y chuleta.

Los diferentes productos son simplemente carne de cerdo, res, ternera, pollo, pavo o conejo, junto con grasa de cerdo, sazónada con sal, cebolla, ajos, chiles y otros condimentos, todo eso metido en una tripa de cerdo o simplemente procesado.

Mientras en el mundo desarrollado el consumo de carne no ha registrado importantes variaciones, el consumo anual per cápita de carne en los países en desarrollo se ha duplicado desde 1980. El crecimiento demográfico y el incremento de los ingresos, junto con los cambios en las preferencias alimentarias, han producido un aumento de la demanda de productos pecuarios. (Castillo, Mercado, Lucia, & Martinez, 2004)

1.1.1 **GANADO VACUNO**

El ganado vacuno o bovino es aquel tipo de ganado que está representado por un conjunto de vacas, bueyes y toros que son domesticados por el ser humano para su aprovechamiento y producción.

La carne de vacuno es un alimento saludable con innumerables propiedades nutricionales ya que aporta fundamentalmente proteínas de alto valor biológico, vitaminas y minerales. (Castillo, Mercado, Lucia, & Martinez, 2004)

Además, incorpora en la alimentación vitaminas, como A, D, E, K, C y del grupo B, especialmente B12, esencial en la formación de los glóbulos rojos y el correcto funcionamiento del sistema nervioso. Las proteínas de la carne de vacuno son de alto valor biológico. Esta elevada calidad nutricional viene determinada por su buena digestibilidad y porque aportan todos los aminoácidos esenciales y en una proporción adecuada a las necesidades del ser humano. (Castillo, Mercado, Lucia, & Martinez, 2004)

El contenido en hidratos de carbono es muy bajo, lo cual permite combinar la carne de vacuno con fuentes de los mismos (vegetales), complementando su valor nutritivo.

El hierro es uno de los valores clave de las carnes en general y de la de vacuno (que contiene 2-4 mg/100g) en particular. La forma en la que se encuentra este hierro permite que se absorba un 20-30% del mismo, mientras que el de los vegetales sólo se absorbe en un 1,5% (llega al 7% en el caso de la soja). Las necesidades diarias de hierro son de unos 10 mg/día, siendo de hasta 18 mg en adolescentes y, especialmente, en las mujeres en periodo fértil. Por lo tanto, unos 100 gramos de vacuno pueden aportar más del 20% del hierro necesario en un día. Además, la presencia de carne favorece la absorción de las formas de hierro de los vegetales, lo que justifica su asociación con verduras y hortalizas. Si no se consume carne puede haber riesgo de no disponer de la cantidad suficiente de hierro. (Castillo, Mercado, Lucia, & Martinez, 2004)

Otro aporte importante de la carne, especialmente de la de vacuno, es el de zinc (100 g pueden llegar a cubrir el 30-40% de las ingestas diaria recomendada), así como de magnesio, potasio, cobre y otros minerales y micro elementos (selenio y otros).

La carne de vacuno aporta vitaminas hidrosolubles del grupo B. Tiene especial interés el contenido en vitamina B12, que no se encuentra en productos vegetales, salvo si son fermentados. La práctica totalidad de los cortes de carne de vacuno contienen unos 2 microgramos por 100 gramos. Las necesidades medias diarias de una persona adulta son de unos 2 microgramos, que se cubren con unos 100 gramos de carne de vacuno. Por lo tanto, la vitamina B12 es otro de los valores nutricionales clave de la carne de vacuno, junto con el hierro y las proteínas. (Castillo, Mercado, Lucia, & Martinez, 2004)

1.1.2 GANADO OVINO

El ganado ovino es constituido por los animales rumiantes de pequeño tamaño, con pelo en el hocico. Algunos tienen cuernos, en los machos son mayores y arrollados en espiral, como las cabras.

Las ovejas, los moruecos, los muflones, las cabras y sus crías pertenecen al grupo taxonómico, con categoría de subfamilia, de los ovinos. (Arenas, y otros, 2009)

La carne ovina pertenece al denominado grupo de las carnes rojas y presenta características particulares, ya que proviene de animales criados y alimentados sobre pasturas naturales en su mayoría.

Este ámbito le provee a la carne propiedades únicas referidas a jugosidad, consistencia y suave textura. El cordero, de mayor consumo y preferencia, es un ovino menor de un año de edad, del cual se obtiene una res que oscila entre los 9 y 15 kg de peso. (Arenas, y otros, 2009)

Tiene proteínas de alto valor biológico que aporta todos los aminoácidos esenciales que el cuerpo no puede sintetizar, ayudando a la formación y reparación de tejidos y hormonas. Esta carne aporta una buena relación de grasas mono y poliinsaturadas entre las cuales se encuentran los ácidos grasos esenciales omega 3 y omega 6, que ayudan a prevenir problemas cardíacos, hipertensión y controlar el nivel de colesterol en sangre. La carne de cordero criado bajo el sistema pastoril comparado con el criado bajo sistemas intensivos, resulta más magra y tiene un menor aporte de grasas saturadas y de colesterol. (Arenas, y otros, 2009)

Aporta vitamina E que actúa como protección frente a diversos agentes químicos y beta-caroteno necesario para el crecimiento, la reproducción, el desarrollo fetal y la respuesta inmune, y propiedades beneficiosas para la piel. Otras vitaminas presentes son la B6 que

influye en desarrollo cerebral durante el embarazo, la infancia y colabora con la producción de anticuerpos, y la B12 que ayuda en la formación de glóbulos rojos, y en el buen funcionamiento de las neuronas. (Arenas, y otros, 2009)

Entre los minerales más importantes que contiene la carne ovina se encuentra el hierro, indispensable para la formación de glóbulos rojos, y el zinc para el buen funcionamiento del sistema inmunológico. También aporta potasio y fósforo.

1.1.3 **GANADO CAPRINO**

El ganado vacuno o bovino es aquel tipo de ganado que está representado por un conjunto de cabras que son domesticados por el ser humano para su aprovechamiento y producción. (Arenas, y otros, 2009)

La carne de cabra es una alternativa saludable de carne de res o de pollo debido a las bajas cantidades de calorías, grasas y colesterol total. Un elemento básico en la cocina del norte de África y del Medio Oriente, la carne de cabra conforma el 63% de la carne roja que se consume en todo el mundo.

Una porción de 3 oz de carne de cabra cuenta con 122 calorías, lo que es considerablemente menor a las 179 y a las 162 calorías de la carne de res y del pollo. En términos de grasa la cabra es mucho más magra que otros tipos de carne. La grasa total de la carne de cabra es de 2,6 g por cada 3 porciones de 3 oz, lo que corresponde a un tercio de 7,9 g de carne de res y a casi la mitad de 6,3 g de pollo. Una porción de carne de cabra representa casi el 4% de tu valor diario de grasa total con base en una dieta de 2.000 calorías. (Arenas, y otros, 2009)

La carne de cabra contiene 63,8 g de colesterol por cada 3 oz, lo que es considerablemente más bajo que los 73,1 g de carne de res y de pollo por cada porción de 73 mg. Comer cabra no causa sacrificios importantes en el componentes sanguíneos como hierro y otros. Los 3,2 mg de hierro por porción de carne de cabra supera los 2,9 mg de la carne de res y duplica los 1,5 mg de la carne de pollo.

La carne animal es una fuente completa de proteínas las cuales están contenidas en los ocho amino ácidos que tu cuerpo no puede crear por su cuenta. Mucha gente lucha para equilibrar la alta proteína de la carne y el alto contenido en grasa. Los 23 g de proteína por porción en la carne de cabra se comparan con los 25 g que se encuentran en una porción de carne de res y de pollo, lo que significa que no tienes que sacrificar ninguna fuente rica en proteínas. De hecho, una porción de 3 oz de carne de cabra cumple con el 46% del valor diario de proteína que la mayor parte de la gente debe consumir. (Arenas, y otros, 2009)

1.1.4 **GANADO PORCINO**

El ganado porcino es muy importante ya que el cerdo es un alimento apreciado en gran parte del planeta. La carne porcina, de hecho, es la más consumida a nivel mundial. Según las estadísticas, la mayor parte de la carne porcina se destina a la preparación de embutidos, fiambres y chacinados. De todos modos, también puede consumirse fresca. (Arenas, y otros, 2009)

La carne de cerdo aporta unas 110 calorías por cada 100 gramos, excepto la hamburguesa, cuyo aporte calórico es de unas 240 calorías. Es rica en proteínas, que representan un 20% del total de su composición, aunque la cantidad proteica está relacionada con la especie y la edad, con lo que puede ser variable.

La grasa es el nutriente que más varía y depende también de la especie, el sexo, la edad y el corte de la carne. Se localiza justo por debajo de la piel, de modo que determinados cortes la pueden eliminar. Contiene ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados, más conocidos como "grasa buena", que están presentes en mayor cantidad que en otro tipo de carnes. Dado que el cerdo tiene grasa en su composición, deberán prestar especial atención los consumidores que padezcan obesidad, patologías cardiovasculares o alteraciones de colesterol o triglicéridos. (Arenas, y otros, 2009)

Al igual que el pescado, contiene ácidos grasos omega 3, con lo que influye en el correcto desarrollo nervioso y del cerebro, previene el riesgo cardiaco y disminuye la presión arterial.

La cantidad de minerales es también destacada, entre ellos, el zinc, hierro, fósforo, sodio y potasio. Según qué parte del animal se elija, habrá mayor o menor cantidad de minerales. Cada 100 ml de sangre contiene 200 mg de sodio (de modo que el consumo de morcilla, elaborado con la sangre, deberá moderarse en las personas hipertensas).

No aporta vitaminas liposolubles, excepto el hígado, con cantidades de vitaminas A y D. En cuanto a las vitaminas hidrosolubles, es muy rica en vitaminas del grupo B, excepto ácido fólico. Sus valores de vitamina B1 y B12 son diez veces mayores que en otras carnes.

Además, la de cerdo es una de las carnes que menos cantidad de purinas contiene.

1.1.5 **AVES**

Las carnes de aves destacan por ser ligeras, fáciles de digerir y masticar, y por su menor contenido calórico en comparación con otras carnes como la de ternera y cerdo. (Albo, 2011)

Estas carnes son ricas en proteínas, sobre todo la parte de la pechuga, de alto valor biológico.

Dicho de otra manera, las carnes de aves contienen una proteína de alta calidad.

En relación con su contenido en grasas, predominan los ácidos grasos saturados y el colesterol.

La grasa está principalmente localizada en la piel, por tanto, es recomendable retirarla para eliminar su contenido sobre todo en dietas para el control del peso.

Con respecto a los micronutrientes, la carne de ave presenta gran cantidad de vitaminas del grupo B y minerales necesarios para nuestro organismo tales como el hierro, potasio, magnesio, zinc o fósforo.

Las carnes de aves pueden elaborarse asadas, a la sal, hervidas, al vapor, cocidas, fritas o salteadas. Generalmente, cuando se cocina asada se deja la piel para que se conserve el jugo y salga más sabrosa y jugosa la pieza. Otra forma de cocinarlas y que queden jugosas, es quitar toda la piel y marinar las presas sin grasa en aceite de oliva, limón, vinagre de vino, hierbas aromáticas y especias. (Harris & Zagory, 2002)

En la actualidad pueden encontrarse distintos tipos de carnes de aves como pollo, gallina, pavo, avestruz, pato o faisán. Los más consumidos son el pavo y el pollo. Además del pollo tradicional, destacan otros tipos de pollo menos común pero con un alto valor gastronómico:

- **Picantón:** El picantón se sacrifica con un mes de edad y con 0,5kg de peso. La carne del picantón es tierna y de sabor suave, apta para preparar al grill o a la parrilla.
- **Pollo tomatero o Pollo coquelet:** Este pollo se sacrifica muy joven con un peso entre 0,5-1kg. El pollo tomatero presenta una carne firme, tierna y jugosa y se emplea tanto para asar al horno como a la parrilla.

- **Capón:** El capón es el macho castrado y sobrealimentado, llegando a alcanzar 3,5-4 Kg. Su carne es blanca, muy sabrosa y aromática debido a su mayor contenido en grasa. Es utilizado especialmente para rellenar o asar.
- **Pularda:** La pularda es la hembra castrada y sobrealimentada sacrificada a los 6-8 meses con un peso de 2,5-3 Kg. Presenta una carne sabrosa y muy blanca que se cocina entera escalfada o asada al horno.
- **Gallina:** Hembra adulta y sacrificada tras agotar su capacidad de puesta. Se emplea principalmente en la elaboración de caldos y sopas, ya que proporciona una carne dura, fibrosa, grasa y de intenso sabor.

La gallina, el pato y el faisán tienen un elevado contenido graso por lo que en principio es mejor la elección de otro tipo de aves. Las que menos grasa aportan son el pavo, codorniz, perdiz y avestruz.

La carne de caza presenta un color más oscuro y un olor típico a “caza”, además de una textura característica de estas especies. En comparación con los animales domésticos, los animales de caza pueden tener una carne más dura, ya que la edad y la época del año afectan notablemente a dicha cualidad. La caza de pluma se puede dividir en:

- Tierra: perdiz, paloma, codorniz, becada.
- Montaña: gallo silvestre, urogallo, perdiz de los Alpes.
- Agua: pato salvaje, polla de agua o gallineta, avefría.

La composición nutricional de los animales de caza es muy variable y difícil de valorar de forma general. Está determinada por factores como la especie, la edad, el sexo o el tipo de alimentación.

1.2 CALIDAD SANITARIA DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS

La carne es un producto de gran importancia en la alimentación Humana, su gran riqueza nutritiva se debe fundamentalmente a su elevado contenido en proteínas de alto valor nutricional, por otro lado es uno de los alimentos más sensibles a la descomposición debido a su alto contenido en agua, composición PH, lo que favorece la alteración y contaminación microbiana, pudiendo constituir un riesgo para la salud, razón por lo cual estos productos en todo momento deben estar conservados en refrigeración a una temperatura no mayor a 7°C. (Arenas, y otros, 2009)

Se deben corroborar las características organolépticas de los alimentos frescos como son color, textura y olor característicos, a fin de aceptar o rechazar los alimentos de origen animal que presenten cualquiera de las siguientes características:

➤ Acepte color:

- **Res:** rojo brillante
- **Cordero:** rojo
- **Cerdo:** rosa pálido

Grasa: blanca

Textura: firme y elástica

Olor: característico

➤ Rechace para el cerdo:

Color: verdoso o café oscuro, descolorida en el tejido elástico

Olor: rancio

- **Aves**

Color: característico

Textura: firme

Olor: característico

➤ Rechace para las aves:

Color: verdosa o amoratada

Textura: blanda y pegajosa bajo las alas

Olor: anormal

El Gobierno de la República, pone a disposición de la industria de alimentos cárnicos, las normas y procedimientos que deben cumplir para certificar que sus unidades de producción (rastros, empacadoras o procesadoras de alimentos), cumplen con la normativa vigente para que los productos que generen sean elegibles para exportar, además de agregar valor a su producción.

Estas disposiciones son las buenas prácticas para el diseño de Establecimientos Tipo Inspección Federal; ya que si un empresario quiere integrarse a esta cadena productiva, debe cumplir inicialmente con un establecimiento que se apegue a los diseños de construcción que exigen los mercados internacionales, los cuales garantizan que el producto final estará libre de cualquier contaminante.

Así, consumidores e industria tienen la seguridad de tener productos inocuos, con procesos estandarizados y áreas de trabajo bien definidas; además de que cada establecimiento TIF cuenta con un médico responsable autorizado que verifica que todo esté en orden para garantizar la calidad de los alimentos.

Hay establecimientos TIF de carne de res, de cerdo, de borrego, de caballo y de conejo, así como procesadoras de carne de hamburguesas, salchichas, jamones, tocino y otros productos cárnicos, que garantizan que dichos productos son de primera calidad y podemos comerlos sin ningún riesgo.

La carne y los derivados cárnicos están sometidos a un estricto control por parte de las autoridades europeas y españolas en cuanto al cumplimiento de requisitos de seguridad alimentaria con un objetivo claro: carne de calidad y segura, desde la granja hasta nuestra mesa.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la seguridad alimentaria consiste en el “acceso físico, social y económico a productos seguros, nutritivos y en cantidad suficiente como para satisfacer los requerimientos nutricionales”. En general, el fin de la seguridad alimentaria es que los alimentos que lleguen al consumidor final sean seguros, desde el punto de vista físico, químico y microbiológico, es decir, exento de sustancias que puedan poner en peligro la salud. (Harris & Zagory, 2002)

La política actual de la UE establece una serie de requisitos fundamentales en cada etapa del proceso de producción de alimentos. Los pilares básicos son:

- Contribuir a una alimentación humana y animal segura y nutritiva, mediante una correcta higiene y manipulación de alimentos.

- Asegurar el bienestar animal.
- Proporcionar una información correcta y transparente al consumidor acerca del origen, contenido y uso de los alimentos gracias a la trazabilidad y el etiquetado.

La legislación vigente establece una serie de requisitos en todas las etapas de la cadena alimentaria: producción, transformación, almacenamiento y transporte hasta el consumidor final.

Para ello, es indispensable que se asegure la correcta trazabilidad del producto. La trazabilidad es la capacidad de poder seguir los pasos de un alimento a través de cada una de las etapas de la cadena alimentaria, gracias al establecimiento de un correcto sistema de identificación y control.

El primer eslabón en la cadena alimentaria es la producción primaria, encargada de la producción o cría de los animales destinados al consumo. Son los responsables de garantizar unas condiciones higiénico-sanitarias apropiadas, evitar riesgos para el medio ambiente, control de contaminantes, plagas, enfermedades animales, así como informar de cualquier sospecha de peligro potencial para la salud humana. (Albo, 2011)

Seguidamente, la industria alimentaria o producción secundaria, es la encargada del proceso de transformación de la materia prima, almacenamiento, envasado, etiquetado y transporte del producto final hasta los puntos de venta.

En la actualidad, y debido a la complejidad de garantizar la seguridad en todos estos procesos, las empresas alimentarias están obligadas a establecer y cumplir estrictamente un plan **Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC)**.

El plan APPCC es un sistema que registra los puntos críticos en los procesos de producción, establece una serie de medidas de control para estos puntos, y detalla medidas correctoras en caso de que se produjera un error a lo largo de la cadena de producción. El fin es garantizar la inocuidad del producto final y, por lo tanto, la salud del consumidor. Posteriormente, un correcto almacenamiento y transporte del producto final hasta el punto de venta es imprescindible, cuidando condiciones de temperatura o humedad, como en el caso de productos refrigerados o congelados. Una vez en el punto de venta, el correcto mantenimiento de la cadena de frío y las condiciones de conservación, son esenciales hasta la venta final del producto, momento en el que las buenas prácticas higiénicas del consumidor, serán las que garanticen la inocuidad del producto en último lugar.

En definitiva, la seguridad alimentaria constituye la pieza clave que garantiza la calidad y seguridad de la carne y los derivados a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria en las granjas, hasta la mesa de los consumidores.

1.2.1 NORMATIVIDAD DE PRODUCTOS CÁRNICOS

NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-213-SSA1-2002**, PRODUCTOS Y SERVICIOS. PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. MÉTODOS DE PRUEBA.

ERNESTO ENRIQUEZ RUBIO, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o. fracciones XXII y XXIV, 13 apartado A) fracción I y II, 17 bis, 194 fracción I, 197, 199, 201, 210, 214 y demás aplicables de la Ley General de Salud; 38 fracciones II, 40 fracciones I, II, XI y XII, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 28, 31 y 34 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 2 literal C fracción X del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud y artículos 3 fracciones I, inciso n y II, y 10 fracción VIII del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, me permito ordenar la publicación en el **Diario Oficial de la Federación** de la Norma Oficial Mexicana **NOM-213-SSA1-2002**, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. (NOM-213-SSA1-2018, 2019)

Que con fecha de 24 de septiembre de 2002, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Control Sanitario de Productos y Servicios, presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana.

Que con fecha 18 de agosto de 2003, en cumplimiento del acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el Diario Oficial de la Federación el proyecto de la Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentarán sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario. (NOM-213-SSA1-2018, 2019)

Que con fecha previa, fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-213-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS.
PRODUCTOS CÁRNICOS PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.
MÉTODOS DE PRUEBA.

Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones sanitarias que deben cumplir los productos cárnicos procesados.

Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el territorio nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

- NOM-004-ZOO-1994, Grasa, hígado, músculo y riñón en aves, bovinos, caprinos, cérvidos, equinos, ovinos y porcinos. Residuos tóxicos. Límites máximos permisibles y procedimientos de muestreo.
- NOM-008-SCFI-1993, Norma Oficial Mexicana. Sistema general de unidades de medida.
- NOM-026-STPS-1993, Seguridad. Código de colores para la identificación de fluidos conducidos por tuberías.
- NOM-030-ZOO-1995, Especificaciones y procedimientos para la verificación de carne, canales, vísceras y despojos de importación en puntos de verificación zoosanitaria.
- NOM-037-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Fiebre Porcina Clásica.
- Modificación a la NOM-040-SSA1-2001, Bienes y servicios. Sal yodada y sal yodada fluorada. Especificaciones sanitarias.
- NOM-051-SCFI-1993, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados.
- NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones sanitarias.
- NOM-092-SSA1-1994, Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-112-SSA1-1994, Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
- NOM-114-SSA1-1994, Método para la determinación de Salmonella en alimentos.
- NOM-120-SSA1-1994, Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.

- Modificación a la NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- NOM-184-SSA1-2002, Bienes y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias.
- NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
- NOM-201-SSA1-2000, Bienes y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.

(NOM-213-SSA1-2018, 2019)

Para fines de esta Norma se entiende por:

Aditivos, a las sustancias que se adicionan directamente a los productos durante su elaboración, para proporcionar o intensificar aroma, color o sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación, entre otras funciones.

Ahumado, al procedimiento por el que se aplica a los alimentos humo para conferir sabor a éstos y reforzar su color, olor o ambos, pudiendo prolongar la vida de anaquel de los mismos.

Área de producción, lugar en el que se lleva a cabo la transformación de la materia prima en los productos objeto de esta Norma.

Bitácora o registro, al documento controlado que provee evidencia objetiva y auditable de las actividades ejecutadas o resultados obtenidos durante el proceso del producto y su análisis.

Buenas prácticas de fabricación, a la cantidad mínima necesaria de un aditivo que se añade al producto para lograr el efecto deseado.

Centro térmico, al área en torno al centro geométrico de la pieza donde se unen los ejes longitudinal y transversal.

Curación, al procedimiento por medio del cual se agregan por vía seca o vía húmeda, sal, azúcares, nitratos, nitritos o ambos.

Desinfección, al conjunto de procedimientos que tienen por objeto la reducción del número de microorganismos.

Distribuidora, al establecimiento donde se reciben, conservan, manipulan o expenden las materias primas de origen animal o los productos objeto de esta Norma y cuyo destino es un establecimiento productor de productos cárnicos o un punto de venta.

Embalaje, al material que envuelve, contiene y protege los productos envasados para efectos de su almacenamiento y transporte.

Envase colectivo, al recipiente o envoltura en el que se encuentran contenidos dos o más variedades diferentes de productos envasados, destinados para su venta al consumidor en dicha presentación.

Envase múltiple, al recipiente o envoltura en el que se encuentran contenidos dos o más unidades iguales de productos envasados con la misma presentación, destinados para su venta al consumidor.

Envase primario, al recipiente destinado a contener un producto y que entra en contacto con el mismo.

Establecimientos productores de productos cárnicos, a las plantas donde se llevan a cabo las operaciones de transformación de la materia prima en los productos objeto de esta Norma.

Etiqueta, al marbete, rótulo, inscripción, imagen gráfica u otra materia descriptiva que se haya escrito, impreso, estarcido, marcado en relieve o en hueco, grabado, adherido, precintado o anexo al empaque o envase del producto.

Fecha de caducidad, a la fecha límite después de la cual se considera que las características sanitarias o de calidad que debe reunir para consumo un producto envasado, almacenado en las condiciones sugeridas por el fabricante, se reducen o eliminan de tal manera que después de esta fecha no debe comercializarse ni consumirse.

Inocuo, a aquello que no hace o no causa daño a la salud.

Límite máximo, a la cantidad establecida de aditivos, microorganismos, parásitos, materia extraña, plaguicidas, biotoxinas, residuos de medicamentos, metales pesados y metaloides que no se debe exceder en un alimento, bebida o materia prima.

Lote, a la cantidad específica de un producto, elaborado en un mismo ciclo, integrado por unidades homogéneas.

Materia extraña, a cualquier sustancia, resto, desecho o material que se presenta en el producto pero que no forma parte de la composición normal de éste.

Método de prueba, al procedimiento analítico utilizado para comprobar que un producto satisface las especificaciones que establece la norma.

Proceso, al conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y expendio o suministro al público de los productos.

Productos cárnicos cocidos, a los elaborados con carne, vísceras, sangre o sus mezclas, curados o no, que son sometidos a proceso térmico. Pueden presentarse enteros, en cortes, emulsionados o troceados.

Productos cárnicos crudos, a los elaborados con carne, vísceras o sus mezclas, que pueden ser o no curados o madurados, y que no son sometidos a algún tratamiento térmico.

Productos cárnicos curados, a los que se agregan por vía húmeda o seca, sal o azúcares, nitratos o nitritos, independientemente de que sean sometidos a algún tratamiento térmico, a maduración o se manejen crudos.

Productos cárnicos desecados, secos o salados, a los sometidos a reducción de la humedad por medio de aire, calor o sal hasta llegar a un valor no mayor de 25%.

Productos cárnicos empanados o rebozados congelados, a los elaborados con carne molida o picada o en piezas, con adición o no de tejido graso, subproductos y aditivos, que pueden recibir un tratamiento térmico durante su elaboración, pero que necesitan ser cocinados para consumirlos.

Productos cárnicos fritos, a los elaborados a partir de carne o piel y que son sometidos a freído en aceite o grasa, con o sin sal, curados o no.

Productos cárnicos madurados, a los que son sometidos a deshidratación parcial, pudiendo ser ahumados o no, sometidos durante cierto tiempo a la acción de cultivos microbianos o enzimas o microorganismos propios de la carne y su acción sobre azúcares añadidos o no. Pueden ser en cortes enteros o troceados.

Productos cárnicos marinados o en salmuera, a los adicionados de sal u otros aditivos por vía seca o húmeda, excepto nitratos o nitritos, pudiendo ser cocidos o no.

Productos cárnicos procesados, a los elaborados a partir de carne, vísceras, estructuras anatómicas, sangre o sus mezclas, provenientes de mamíferos o aves, que pueden someterse a ahumado, cocción, curación, desecación, maduración, salado, entre otros.

Punto de venta, al lugar donde se reciben, almacenan, exhiben, manipulan y expenden los productos objeto de esta Norma.

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

% por ciento

< menor que

± más o menos

/ por

°C grados Celsius

cm centímetro

g gramo(s)

kcal kilocalorías

kg kilogramo

kj kilojoule

M molar

mg miligramo

mL mililitro

mm milímetro

N normal

nm nanómetro

NMP número más probable

pH potencial de Hidrógeno

UFC unidades formadoras de colonias

v volumen

v/v volumen sobre volumen (NOM-213-SSA1-2018, 2019)

Cuando en la presente Norma se mencione al Acuerdo, debe entenderse que se trata del Acuerdo por el que se determinan las sustancias permitidas como aditivos y coadyuvantes y sus modificaciones.

Además de cumplir con lo establecido en la NOM-120-SSA1-1994, los establecimientos productores de productos cárnicos y los puntos de venta deben cumplir con lo siguiente:

- El agua que se utilice en el proceso de los productos objeto de esta Norma debe cumplir con las especificaciones microbiológicas establecidas en la NOM-127-SSA1-1994, citada en el apartado de referencias.
- El agua no apta para consumo humano u otros líquidos, deben circular por tuberías separadas e identificadas de acuerdo con lo señalado en la NOM-026-STPS-1993, citada en el apartado de referencias. Las tuberías de los fluidos que no estén considerados en dicha Norma, deben identificarse conforme al código que determine cada empresa, el cual se colocará en un lugar visible para el personal.
- Los productos de importación, además de cumplir con esta Norma, deben cumplir con lo señalado en la NOM-030-ZOO-1995, citada en el apartado de referencias.
- Se debe contar con programas y procedimientos escritos de limpieza y desinfección, de las instalaciones y equipo, así como del mantenimiento de los dispositivos para el registro de tiempos y temperaturas, según corresponda.
- Cuando no se encuentren en uso, el equipo, los detergentes, desinfectantes y otras sustancias que se utilicen para la limpieza y desinfección del establecimiento, deben resguardarse en un área exclusiva, identificada y aislada del área de proceso. Debe evitarse que los equipos o sustancias que se encuentren en uso dentro del área de producción entren en contacto con materias primas, productos o instalaciones que los contengan. En el caso de los plaguicidas deben mantenerse en un área aislada bajo resguardo de personal autorizado por la Secretaría de Salud.

- Cualquier producto, materia prima o ingrediente debe colocarse en mesas, estibas, tarimas, anaqueles, estantes, entrepaños o cualquier estructura que evite el contacto directo con el piso, paredes o techo.
- Los productos cárnicos cocidos y los crudos, cuyo porcentaje de humedad sea mayor de 35%, deben almacenarse de manera que su temperatura en el centro térmico sea de 7°C como máximo.
- Los productos congelados deben mantener una temperatura mínima en su centro térmico suficiente para alcanzar el tiempo de vida de anaquel que establezca el fabricante.

➤ Personal

- El personal del área de producción debe usar ropa de trabajo, calzado de hule o industrial y cubrepelo. El personal que entre en contacto directo con el producto, además debe utilizar cubrebocas. Los mandiles y el calzado de hule deben lavarse y desinfectarse como mínimo al inicio, al reingresar a las áreas de proceso y al final de la jornada. El establecimiento debe proporcionar la ropa de trabajo limpia.
- El personal debe lavarse y desinfectarse las manos y antebrazos, así como cepillarse las uñas antes de ingresar a las áreas de proceso, después de entrar en contacto con tejidos o partes no aptas y antes de manipular productos cocidos si ha entrado en contacto con materias primas, productos crudos o madurados.
- Se debe retirar o reubicar de las áreas de producción al personal que presente alguno de los siguientes signos clínicos: tos frecuente, secreción nasal, vómito, diarrea, fiebre o lesiones

en la piel. El personal que haya presentado alguno de los signos anteriores sólo podrá reintegrarse a sus actividades hasta haber sanado.

- Los responsables de los establecimientos productores de productos cárnicos, deben proporcionar ropa de trabajo limpia y canastillas o casilleros para que el personal pueda guardar la ropa de calle y artículos personales, dichos casilleros o canastillas deben ubicarse fuera de las áreas de producción.
- No debe entrar en contacto directo con dinero.

➤ Específicas

- Los establecimientos productores de productos cárnicos, además de lo anterior, deben cumplir con lo siguiente:
- En las áreas donde se realicen las operaciones que van desde la recepción de animales hasta el faenado, corte o deshuese, se debe cumplir con lo señalado en la norma NOM-194-SSA1-2004, señalada en el apartado de referencias.
- El proceso debe ser lineal y fluido, de forma que no existan retrocesos ni contaminación cruzada con los productos en distintas etapas de proceso.
- A la entrada de las áreas de proceso, excepto en las cámaras de almacenamiento, refrigeración o congelación, debe existir un tapete sanitario con solución desinfectante; así como lavamanos, jabón sólido o líquido, cepillos para uñas, solución desinfectante, toallas desechables o secador de aire caliente, un recipiente con tapa para los papeles, de accionamiento de pedal y una protección que evite salpicaduras a las materias primas o a

los productos. Se debe contar con letreros en los que se señale a los trabajadores la obligación y la importancia del lavado y desinfección.

- Todo el material y equipo que entre en contacto directo con el producto, debe lavarse y desinfectarse antes del inicio de la jornada, al final de ésta o cuando se vayan a procesar materias primas o diferentes tipos de productos.

➤ Iluminación

- Se debe contar con iluminación natural o artificial en todas las áreas, ésta no debe dar lugar a confusión en tonalidades o colores.
- A partir de su recepción, las canales, medias canales y cuartos de canal deben mantenerse suspendidas mediante un sistema de rieles. El traslado de vísceras y estructuras anatómicas debe hacerse en envases de material sanitario. Cuando se opte por mantener suspendida la materia prima o los productos, esto debe hacerse de manera que exista una distancia no menor de 30 cm entre el piso, paredes y techo y la parte más cercana de la materia prima o los productos.
- En el caso de cajas de plástico, las que entren en contacto directo con el piso, no se deben apilar, estibar o usar para contener productos y deben identificarse con un color distinto.
- La materia prima debe inspeccionarse durante la recepción, a fin de eliminar toda aquella no apta para consumo humano, debiéndose contar con recipientes específicos y rotulados para su almacenamiento. Estos recipientes sólo podrán llenarse hasta el punto en que las tapas no entren en contacto con el producto contenido en ellos y deben ser enviados a un área de confinamiento o destrucción por lo menos en cuanto se llenen.

- La descongelación de las materias primas debe llevarse a cabo en áreas específicas que cumplan con lo señalado en los puntos 5.1.3.5 y 5.1.3.6 cuya temperatura ambiente sea de 10°C como máximo.
- La materia prima, ingredientes y producto terminado, no deben entrar en contacto directo con pisos, paredes o techos.
- Cuando se utilicen vísceras y estructuras anatómicas, éstas deben ser lavadas en el establecimiento de origen y almacenadas a temperatura de refrigeración o congelación, excepto las saladas, no debiendo entrar en contacto directo con otras materias primas.
- En el caso de las vísceras, deben lavarse interna y externamente, antes del retiro de las mucosas, conservarse en refrigeración o congelación y someterse a lavado y desinfección antes de su uso. Las mucosas y contenidos deben ser manejados de conformidad con lo señalado en el punto 5.1.3.8.
- La materia prima perecedera debe mantenerse durante su almacenamiento a temperaturas no mayores a 7°C en su centro térmico.
- Deben existir recipientes de desinfección con agua a una temperatura de 82,5°C para instrumentos de corte o contar con un procedimiento equivalente. Los instrumentos de corte deben desinfectarse cada vez que entren en contacto con el piso, tejidos o partes no aptas, cada vez que haya alguna interrupción de las actividades o antes de utilizarse en productos cocidos, si fueron utilizados en materias primas o productos crudos o madurados.

- La sal que se utilice para la elaboración de los productos objeto de esta Norma, debe cumplir con las especificaciones establecidas en la Modificación a la NOM-040-SSA1-2001, citada en el apartado de referencias.
- El hielo que se utilice para la elaboración de los productos objeto de esta Norma, debe cumplir con las especificaciones microbiológicas establecidas en la NOM-201-SSA1-2002, citada en el apartado de referencias.
- En aquellos productos en los que se adicionen aditivos, se debe contar con un manual o instrucciones claramente visibles para el personal en las que se establezcan los procedimientos para dosificar. Los recipientes en los que se almacenen los aditivos deben estar rotulados de manera que se identifique su nombre, manejo y las instrucciones de conservación.
- En el caso de los productos en los que se utilice sangre, los recipientes utilizados deben lavarse inmediatamente después de su vaciado y mantenerse en áreas limpias y protegidas del polvo y fauna nociva.
- Los productos cocidos deben alcanzar como mínimo una temperatura de 70°C en su centro térmico, o una relación tiempo-temperatura equivalente.
- Los productos cárnicos sometidos a un proceso de esterilidad comercial, además de cumplir con lo señalado en esta Norma a excepción de las especificaciones microbiológicas, deben cumplir con las disposiciones sanitarias y especificaciones microbiológicas establecidas en la NOM-130-SSA1-1995, citada en el apartado de referencias.

- En el caso de los productos cárnicos envasados, el recubrimiento interno de los envases metálicos debe cumplir con lo que se establece en la NOM-130-SSA-1995, citada en el apartado de referencias.
- Cuando se utilicen telas para cubrir las carnes durante su secado o cocción, deben lavarse y desinfectarse previamente con agua a una concentración máxima de cloro de 20 mg/L y mantenerse protegidas de polvo y fauna nociva.
- El diseño de las cámaras de congelación, debe permitir la recolección del agua de desescarche y evitar la condensación. Debe contar con suficiente capacidad de almacenamiento para permitir la circulación de aire frío por todos los productos.
- Cuando se realice el ahumado natural, la madera empleada no debe ser oleosa, resinosa ni pintada o barnizada.

(NOM-213-SSA1-2018, 2019)

➤ Límites máximos para microorganismos y parásitos

Producto	Mesófilos aerobios (UFC/g)	Coliformes fecales (NMP/g)	Salmonella spp en 25 g	Trichinella spiralis	Cisticercos
Cocidos	10,000 ¹ 60,000 ²	< 3	Ausente	N.A.	N.A.
Crudos	N.A.	N.A.	Ausente	Ausente ³	N.A.
Curados	N.A.	< 3	Ausente	N.A.	N.A.
Marinados o en salmuera	N.A.	< 3	Ausente	N.A.	N.A.
Fritos	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	Ausente

Tabla 1. Límites máximos

Donde:

1= en planta

2= en punto de venta

2= no aplica a madurados crudos

3= N.A. = No aplica

➤ Aditivos para alimentos

	Cocidos	Curados Crudos	Curados Madurados	Empanados o rebozados congelados	Desecados, secos, marinados o en salmuera
Acido alginico y sus sales de sodio, potasio y propilenglicol	4000	4000	4000 ⁵	4000	N.P.
Acido eritrbico y sus sales de sodio	500	N.P.	500 ⁵	N.P.	N.P.
Acido fosfórico ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.
Acido L (+) tartárico y sus sales de sodio y potasio	2400	2400	2400	N.P.	N.P.
Acido sórbico y sus sales de sodio y potasio ²	1000	1000	1000 ⁶	N.P.	N.P.
Alfa tocoferol	3000	N.P.	3000 ⁶	N.P.	N.P.
Butil hidroxianisol ³	100	N.P.	100 ⁶	N.P.	100
Butilhidroxiquinona terciaria ³	100	N.P.	100 ⁶	N.P.	100
Butilhidroxitolueno ³	100	N.P.	100 ⁶	N.P.	100
Fosfato disódico ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.
Hexametafosfato de sodio ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.
Mezcla de tocoferoles concentrados	50	N.P.	50 ⁶	N.P.	N.P.
Nitratos o nitritos de sodio o potasio ^{4,7}	156	156	156	N.P.	N.P.
Propil-p-hidroxibenzoato ²	1000	1000	1000 ⁵	N.P.	N.P.
Pirofosfato ácido de potasio ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.
Pirofosfato ácido de sodio ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.
Pirofosfato disódico ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.
Pirofosfato tetra-sódico ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.
Polifosfato de sodio ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.
Propionato de sodio ²	1000	N.P.	100 ⁵	N.P.	N.P.
Rojo allura	100	100	100 ⁵	N.P.	100
Trifosfato pentasódico ^{1,7}	3100	3100	3100	3100	N.P.

Límites máximos para los productos objeto de esta Norma (mg/kg)

➤ Contaminantes

Los productos cárnicos procesados deben cumplir con las siguientes especificaciones:

Contaminante	Límite máximo (mg/kg)	Producto
Arsénico (As)	0,5	Cocidos envasados en recipiente metálico
Cadmio (Cd)	0,1	Productos cárnicos procesados
Estaño (Sn)	100,0	Cocidos envasados en recipiente metálico
Plomo (Pb)	1,0	Productos cárnicos procesados

Tabla 3. Límites máximos (NOM-213-SSA1-2018, 2019)

➤ Control documental del proceso

El proceso de los productos objeto de esta Norma debe documentarse en bitácoras o registros, de manera que garantice los requisitos establecidos en la Tabla 4. Los registros o bitácoras incluyendo los que se elaboren por medios electrónicos deben:

- a) Contar con respaldos que aseguren la veracidad de la información y un procedimiento para la prevención de acceso y correcciones no controladas.
- b) Conservarse por lo menos durante 1 año y estar a disposición de la autoridad sanitaria cuando así lo requiera.
- c) El diseño del formato queda bajo la responsabilidad del particular.

De conformidad con el Trámite SSA-04-015. "Conservación de información sobre el proceso de producción".

* aplica en planta y punto de venta.

** en los puntos de venta incluye las unidades de corte.

- Adicionalmente se debe contar con la siguiente documentación:
- 1. Diagramas de bloque en los que se describa de manera sintética el proceso de elaboración del producto.
- 2. Planos de distribución de áreas, indicando flujo de producto y personal.

(NOM-213-SSA1-2018, 2019)

MUESTREO

- El procedimiento de muestreo de los productos objeto de esta Norma, se debe sujetar a lo siguiente:
 - 1. Cuando existan productos envasados en presentaciones menores a 1 kg deben tomarse con el envase original sin violación tomando unidades que correspondan a dicha cantidad.
 - 2. Cuando las presentaciones de productos preenvasados sean mayores a 1 kg o venta a granel, la muestra debe ser proporcionada por el personal del área de venta al público.
 - 3. Se debe depositar la muestra en un recipiente estéril y transportar en refrigeración.
- Identificación de la muestra
 - 1. En caso de productos en presentación mayor a 1 kg o de venta a granel la muestra debe ser identificada con la siguiente leyenda: "producto manipulado en punto de venta".
 - 2. Toda muestra debe indicar la temperatura a la cual fue tomada. (NOM-213-SSA1-2018, 2019)

MÉTODOS DE PRUEBA

- Para la verificación oficial de las especificaciones sanitarias que se establecen en esta Norma, se deben aplicar los métodos de prueba citados en el apartado de referencias.
- Para la verificación oficial de la especificación de coliformes fecales se aplicará la NOM-112-SSA1-1994, citada en el apartado de referencias.
- Para la determinación de *Trichinella spiralis* se aplicará el método de prueba establecido en la NOM-194-SSA1-2004, citada en el apartado de referencias.
- Durante el análisis de las muestras se deberán incorporar controles para evaluar el desempeño del analista y de la técnica, tales como blancos, duplicados de análisis, control positivo y muestra adicionada con el analito de interés para evaluar el porcentaje de recuperación.
- Determinación de nitratos y nitritos.
- Preparación de la muestra:

Pasar rápidamente 3 veces a través de un molino de alimentos con placas de aproximadamente 3 mm de abertura, mezclar perfectamente después de cada molienda y comenzar la determinación lo más rápido posible.

- Determinación de nitritos (método colorimétrico).

1. Principio (fundamento del método):

Este método se basa en la reacción del analito en medio ácido para formar una sal diazonio que acoplada a aminas aromáticas produce un colorante azo (diazotización de Griess). Esta reacción de color es monitoreada fácilmente por medio de espectrofotometría.

2. Equipo:

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

Espectrofotómetro de ultravioleta visible.

Baño de vapor.

3. Materiales:

Matraz volumétrico de 250 mL

Tubos de Nessler de 50 mL

Pipetas volumétricas de 2 mL

Pipetas graduadas de 10 mL

Vaso de precipitados de 50 mL

4. Reactivos

- Reactivo de Griess:

- ✚ Disolver 0,5 g de ácido sulfanílico en 30 mL de ácido acético glacial y 120 mL de agua destilada. Filtrar si es necesario (guardar en refrigeración).

- ✚ Disolver 0,1 g de N-1-naftiletilendiamina (NED) en 120 mL de agua destilada calentando, enfriar, agregar 30 mL de ácido acético glacial y filtrar (guardar en refrigeración). Si cualquiera de las soluciones se torna colorida, agitar con 0,5 g de zinc en polvo y filtrar. Mezclar ambas soluciones y guardar en frasco ámbar.

- Solución saturada de Cloruro de mercurio (HgCl_2).

- Solución patrón de nitrito de sodio.

✚ Pesar 0,5 g de Nitrito de sodio (NaNO_2) puro, disolver en 1 litro de agua destilada libre de nitritos. Diluir 10 mL de esta solución a un litro con agua destilada (1 mL = 0,005 mg de NaNO_2).

5. Procedimiento

- Preparación de la curva de comparación.

✚ En el caso de que se evalúen productos cárnicos curados se preparará la siguiente curva de calibración:

En tubos de Nessler de 50 mL o en tubos de ensaye de 60-70 mL, medir solución patrón: 0,0, 0,1, 0,5, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 14,0, 16,0, 18,0 mL y llevar a la marca de 50 mL con agua destilada, agregar 2 mL del reactivo de Griess. Mezclar perfectamente y después de 20 minutos, leer en Espectrofotómetro de ultravioleta visible a 520 nm. Ajustar el cero del instrumento con el blanco. Trazar una curva graficando concentraciones (en mg de NaNO_2) contra absorciones o usar estos patrones para comparar visualmente.

✚ En el caso de que se evalúen productos cárnicos no curados se preparará la siguiente curva de calibración:

En tubos de Nessler de 50 mL o en tubos de ensaye de 60-70 mL, medir solución patrón de nitrito de sodio diluida: 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,8 y 1,0 mL y llevar a la marca de 50 mL con agua destilada y libre de nitritos, agregar 2 mL del reactivo de Griess. Mezclar perfectamente y después de 20 minutos, leer en Espectrofotómetro de ultravioleta visible a 520

nm. Ajustar el cero del instrumento con el blanco. Trazar una curva graficando concentraciones (en mg de NaNO₂) contra absorciones o usar estos patrones para comparar visualmente.

- Desarrollo de la prueba.

✚ Pesar 2 g de muestra preparada como se indica en (Preparación de muestra) en un vaso de precipitados de 50 mL y agregar aproximadamente 40 mL de agua libre de nitritos y calentada a 80°C, mezclar perfectamente con un agitador teniendo cuidado de romper todos los grumos, transferir todo el contenido a un matraz volumétrico de 250 mL, lavar el vaso y el agitador con varias porciones de agua caliente (160 mL aproximadamente).

✚ Colocar el matraz en baño de vapor por espacio de 2 horas, agitando ocasionalmente. Agregar 5 mL de solución saturada de cloruro mercúrico y mezclar. Si hay color añadir menos de 5 g de carbón vegetal y agitar. Enfriar a temperatura ambiente, diluir a la marca con agua libre de nitritos y mezclar. Filtrar hasta obtener un filtrado claro, libre de turbidez. Tomar una alícuota de 50 mL en tubos de Nessler, agregar 2 mL de reactivo de Griess, mezclar y dejar reposar 20 minutos para desarrollar color. Este color puede leerse visualmente con su respectiva escala por comparación o bien leer su absorción en un Espectrofotómetro de ultravioleta visible a 520 nm, ajustando el aparato a cero de transmisión con el blanco de reactivos.

6. Expresión de resultados.

- Cálculos.

$$\frac{\text{mg/kg de NaNO}_2}{\text{PM}} = \frac{L \times 5 \times 1000}{X}$$

En donde:

L = Lectura en curva de NaNO₂

PM = Peso de la muestra.

7. Informe de prueba

- Determinación de Nitrato (método colorimétrico).

1. Principio del método.

2. Equipo.

Baño de agua.

Balanza analítica con sensibilidad de 0,1 mg.

Espectrofotómetro de ultravioleta visible.

3. Materiales

Matraces volumétricos de 100 mL

Tubos de Nessler de 50 mL

Pipetas volumétricas de 25 mL

Cápsulas de porcelana de 10 cm de diámetro.

4. Reactivos

- Solución de ácido fenol disulfónico.

Calentar 6 g de fenol con 37 mL de ácido sulfúrico concentrado en un baño de vapor hasta disolución total, enfriar y agregar 3 mL de agua.

- Crema de alúmina.

Preparar una solución saturada en agua de sulfato de potasio y aluminio con 12 moléculas de agua. Añadir hidróxido de amonio con agitación constante hasta que la solución sea alcalina al tornasol, dejar que se asiente el precipitado y lavar por decantación con agua hasta que el agua del lavado dé ligera reacción para sulfatos con cloruro de bario (BaCl_2). Tirar el exceso de agua y guardar la crema residual en frasco cerrado.

- Solución de acetato de plomo básico.

Calentar 430 g de acetato de plomo básico, 130 g de óxido de plomo y 1 litro de agua por 30 minutos.

Dejar enfriar y sedimentar. Decantar el líquido sobrenadante y ajustar su densidad a 1,25 con agua recién hervida.

- Solución patrón de comparación.

Disolver 1 g de nitrato de sodio puro y seco en agua, diluir a 1 litro. Evaporar 10 mL de esta solución a sequedad en baño de vapor, agregar 2 mL de ácido fenol disulfónico y mezclar rápida y perfectamente con la ayuda de un agitador de vidrio, calentar cerca de 1 minuto en baño de vapor y diluir con agua a 100 mL [1 mL = 0,1 mg de Nitrato de sodio (NaNO_3)].

- Hidróxido de amonio grado reactivo.

- Solución saturada de sulfato de plata.

5. Procedimiento

- Preparación de la curva de comparación.
- En tubos de Nessler de 50 mL, medir de 1 a 20 mL de la solución patrón, agregar 5 mL de hidróxido de amonio a cada tubo y diluir a 50 mL. Los tubos patrones así preparados, son estables por algunas semanas, si se guardan perfectamente tapados. Leer el color obtenido en un Espectrofotómetro de ultravioleta visible a 420 nm. Trazar una curva graficando absorciones contra concentraciones.
- Hacer otra curva evaporando 10 mL de la solución concentrada (1 g de nitrato de sodio en 1 L de agua), agregar 2 mL del reactivo, mezclar rápida y perfectamente con un agitador de vidrio. Calentar un minuto en baño de agua y diluir a 1 l (1 mL = 0,01 mg de NaNO₃). Preparar una serie de tubos usando cantidades que vayan de 1-20 mL, agregar 5 mL de hidróxido de amonio a cada tubo y diluir a 50 mL. Leer el color obtenido en un Espectrofotómetro de ultravioleta visible a 420 nm. Trazar una curva graficando absorciones contra concentraciones.
- Desarrollo de la prueba
- Pesar de 1-2 g de muestra preparada como se indica en Preparación de la muestra en un matraz volumétrico de 100 mL, agregar 20-30 mL de agua y calentar en baño de agua por 15 minutos agitando ocasionalmente.
- Agregar 3 mL de solución saturada de sulfato de plata libre de nitratos, agitar. Agregar 10 mL de solución de acetato básico de plomo y 5 mL de crema de alúmina, agitando después

de cada adición. Dejar enfriar y diluir a la marca con agua, agitar y filtrar a través del papel, regresando el filtrado hasta que pase claro.

- Evaporar 25 mL del filtrado a sequedad, agregar 1 mL de solución de ácido fenol disulfónico, mezclar rápida y perfectamente con un agitador de vidrio, agregar 1 mL de agua, 3-4 gotas de ácido sulfúrico y calentar en baño de agua de 2-3 minutos teniendo cuidado de no secar la muestra.
- Agregar cerca de 25 mL de agua y un exceso de hidróxido de amonio, transferir a un matraz volumétrico de 50 mL o a 1 tubo de Nessler de 50 mL. Agregar 0,5-1,0 mL de crema de alúmina si no está completamente claro; diluir a la marca y filtrar.
- Preparar un blanco de muestra evaporando otros 25 mL del filtrado clarificado, agregar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, mezclar rápida y perfectamente con un agitador de vidrio, agregar 1 mL de agua y calentar en baño de agua durante 2-3 minutos, teniendo cuidado de no secar la muestra; agregar 25 mL de agua y un exceso de hidróxido de amonio, transferir a un tubo de Nessler de 50 mL y llevar a la marca. Con este blanco ajustar a cero el aparato y leer la muestra. Comparar la muestra contra tubos patrón o leer a 420 nm para interpolar con una curva patrón.

6. Expresión de resultados

- Cálculos

$$\text{mg/kg de NaNO}_3 = \frac{L \times 4 \times 1000}{PM}$$

PM

En donde:

L = lectura en la curva de NaNO₃ en mg

PM = peso de la muestra

7. Informe de la prueba

mg/kg de NaNO₃

(NOM-213-SSA1-2018, 2019)

ETIQUETADO

Además de lo que establece la NOM-051-SCFI-1994, la etiqueta de los productos cárnicos procesados envasados objeto de esta Norma, debe sujetarse a lo siguiente:

1. Generales

- Cuando en las etiquetas se declaren u ostenten en forma escrita, gráfica o descriptiva que los productos, su uso, ingredientes o cualquier otra característica, están recomendados, respaldados o aceptados por centros de investigación, asociaciones, entre otros, los cuales deberán contar con reconocimiento nacional o internacional de su experiencia y estar calificados para dar opinión sobre la información declarada. Se deberá contar con el sustento técnico respectivo, el que estará a la disposición de la Secretaría en el momento que lo solicite. Dichas declaraciones deben sujetarse a lo siguiente:
 - La leyenda debe describir claramente la característica referida.
 - Estar precedida por el símbolo o nombre del organismo
 - Figurar con caracteres claros y fácilmente legibles

2. Específicas

- Cuando se trate de productos con modificaciones en su composición, referentes a menor contenido de sodio, grasa, grasa saturada, colesterol, calorías o adicionados, deben ostentar las denominaciones establecidas en la NOM-086-SSA1-1994.
- En el caso de que el producto haya sido objeto de algún tipo de tratamiento, se puede indicar el nombre de éste.

3. Lista de ingredientes

- En la lista de ingredientes debe emplearse el nombre específico de los mismos, incluyendo la especie o especies.
- Los aditivos empleados en la elaboración de los productos objeto de esta Norma, deben reportarse con el nombre común o los sinónimos establecidos en el Acuerdo y sus modificaciones, a excepción de los saborizantes y las enzimas, los cuales pueden figurar con la denominación genérica.

4. Fecha de caducidad.

- En el caso de los productos cárnicos cocidos y crudos con un porcentaje de humedad igual o mayor de 35%, debe aparecer la fecha de caducidad.
- Cuando se conserven en refrigeración, debe aparecer la fecha de caducidad, señalando día, mes y año.
- Cuando se conserven en congelación, debe aparecer la fecha de caducidad, señalando cuando menos mes y año.

5. Leyendas de conservación.

- En el caso de los productos cárnicos cocidos y crudos con un porcentaje de humedad igual o mayor de 35%, debe aparecer la leyenda: "consérvese en refrigeración o congelación", según sea el caso.
- Para el caso de los productos congelados, debe aparecer la leyenda: "Una vez descongelado, no debe volverse a congelar".

6. Leyendas precautorias o de advertencia.

- En el caso de los productos cárnicos crudos, debe aparecer la leyenda: "este producto debe consumirse bien cocido" o equivalente.

7. Envases múltiples o colectivos.

- Cuando los productos objeto de este ordenamiento se encuentren en un envase múltiple o colectivo para su venta al consumidor, éste debe contar con la información que se refiere la presente Norma Oficial
- Mexicana, en tanto que los envases individuales podrán ostentar en sus etiquetas la misma información o sólo la indicación de lote; fecha de caducidad, en su caso; además de la leyenda "No etiquetado para su venta individual".
- Cuando el envase esté cubierto por una envoltura, debe figurar en ésta toda la información necesaria, excepto en los casos en que la etiqueta aplicada al envase pueda leerse fácilmente a través de la envoltura exterior.

8. Productos empacados en punto de venta deben ostentar una leyenda con la siguiente información:

- a) nombre o denominación del producto.

b) declaración de contenido

c) fecha de envasado y en su caso, de caducidad

d) cualquier indicador que permita la rastreabilidad del producto, si no está considerado en los datos del inciso c. (NOM-213-SSA1-2018, 2019)

ENVASE Y EMBALAJE

1. Envase.

- Los productos objeto de esta Norma se deben envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborados con materiales inocuos y resistentes a distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren sus características microbiológicas, físicas, químicas y sensoriales.

2. Embalaje.

- Se debe usar material resistente que ofrezca la protección a los envases para impedir su deterioro exterior a la vez que faciliten su manipulación, almacenamiento y distribución.

9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

- Esta Norma es parcialmente equivalente con las Normas del Codex para: la carne tipo "corned beef" (Codex Stan 88-1981), la carne tipo "luncheon" (Codex Stan 89-1981), jamón curado y cocido (Codex Stan 96-1981), espaldilla de cerdo curada y cocida (Codex Stan 97-1981), carne picada curada y cocida (Codex Stan 98-1981), debido a que estas normas incluyen aspectos comerciales que no son competencia de la Secretaría de Salud, se trata de productos específicos, mientras que nuestra

normatividad se enfoca a grupos de procesos y productos, y no es equivalente con normas mexicanas.

11. Observancia de la Norma

La vigilancia del cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud, a los gobiernos de las entidades federativas, en el ámbito de sus respectivas competencias, y a los organismos de tercera parte habilitados para tal efecto.

La presente Norma Oficial Mexicana deroga a las siguientes normas oficiales mexicanas:

NOM-122-SSA1-1994, Bienes y servicios. Productos de la carne. Productos cárnicos curados y cocidos, y curados emulsionados y cocidos. Especificaciones sanitarias.

NOM-145SSA1-1995, Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

12. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor en todos los apartados a los 60 días posteriores a la fecha de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**. (NOM-213-SSA1-2018, 2019)

1.2.2 MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS

Los microorganismos mesófilos en alimentos son aquellos microorganismos que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una zona óptima entre 30°C y 40°C

El método de recuento de microorganismos mesófilos se basa en la certeza de que un microorganismo viable presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio de cultivo nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30°C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por mililitro de alimento. (Chan, 2002)

Se debe considerar que el valor numérico obtenido puede no reflejar el número real de microorganismos viables en la muestra debido a las siguientes posibilidades:

1. Las células microbianas suelen agruparse formando cadenas, grumos, racimos o pares y no separarse a pesar de la homogeneización y dilución de la muestra, por tanto, una colonia puede provenir de una célula individual o de un agrupamiento bacteriano.
2. Las células microbianas que han sufrido graves lesiones son incapaces de multiplicarse.
3. Las condiciones inadecuadas de aerobiosis, nutrición y temperatura; la presencia de inhibidores y el uso incorrecto.

El recuento de microorganismos mesófilos sirve para realizar una estimación de número total de bacterias que hay en un alimento, sin identificar los diferentes tipos de gérmenes.

Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración. Tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento esté exento de patógenos o de sus toxinas; tampoco un recuento total elevado significa, inevitablemente, presencia de microbiota patógena. Excepto en productos que se elaboran mediante fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de alimentos. (Chan, 2002)

Su significado es diverso:

Materia prima excesivamente contaminada.

Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos o platos preparados.

Posibilidad de que entre ellos puedan haber patógenos, dado que también suelen ser mesófilos.

Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores o iguales a 1.000.000 – 10.000.000 de bacterias por gramo de producto alimentario suelen ser ya inicio de descomposición.

1.2.3 ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas. Sin embargo algunas de ellas, como *E. coli* productora de toxina Shiga, pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. La bacteria se transmite al hombre principalmente por el

consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas. (D'Aoust, 2007)

E. coli productora de toxina Shiga produce toxinas conocidas como toxinas Shiga por su semejanza con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*. *E. coli* productora de toxina Shiga puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua (a_w) mínima de 0,95.

E. coli productora de toxina Shiga se destruye cociendo los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70 °C o más. *E. coli* O157: H7 es el serotipo de *E. coli* productora de toxina Shiga más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos. (D'Aoust, 2007)

1.2.4 LISTERIA MONOCYTOGENES

L. monocytogenes es un bacilo grampositivo, anaerobio facultativo, de crecimiento intracelular, no esporulado, catalasa positivo y oxidasa negativa, que crece fácilmente en agar sangre, produciendo hemólisis incompleta. La bacteria posee de uno a seis flagelos y exhibe una característica motilidad rotatoria “de movimientos tambaleantes” a 25°C. El crecimiento óptimo ocurre entre los 30-37°C, pero crece mejor que otras bacterias a temperaturas bajas (entre 4 y 10°C) y es resistente a los ambientes con pH bajo y alto contenido en sal. Estas características diferenciales con respecto a otros gérmenes, la convierten en un patógeno importante en la industria alimentaria. (D'Aoust, 2007)

En la tinción de gram, *Listeria* puede confundirse con un estreptococo, un enterococo o un difterioide, hecho que debe ser tenido en cuenta a la hora de interpretar los resultados en la práctica

clínica. En el laboratorio, crece fácilmente en medios de cultivo habituales de líquidos estériles, como sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR), pero no se aísla en el coprocultivo, ya que los medios usados de rutina inhiben su crecimiento.

Recientemente, han sido identificadas 17 especies del género *Listeria* spp.. Solo *L. monocytogenes* es patógena en humanos, aunque se han comunicado casos anecdóticos de infección por otras especies en individuos inmunodeprimidos. Existen, al menos, 13 serotipos basados en los antígenos O celular y H flagelar, aunque los subtipos productores de enfermedad son: 4b, 1/2a y 1/2 b. Técnicas de electroforesis en campo pulsado (PFGE) o *ribotyping* pueden ser empleadas para detectar brotes con fines epidemiológicos. (Burtin, 2005)

1.2.5 SALMONELLA SPP

La *Salmonella* es una bacteria que frecuentemente da origen a enfermedades causadas por los alimentos, también conocidas como “intoxicaciones alimentarias”. Los CDC estiman que cada año en los Estados Unidos la *Salmonella** da origen a 1 millón de casos de enfermedades causadas por los alimentos. En los últimos años, los *brotes de salmonelosis** han sido vinculados a la contaminación de pepinos, pollo, huevos, pistachos, atún crudo, germinados y muchos otros alimentos. (D'Aoust, 2007)

La *Salmonella* se puede encontrar en muchos alimentos, entre ellos la carne de res, la carne de pollo, los huevos, las frutas, la carne de cerdo, los germinados, las verduras, e incluso los alimentos procesados, como las mantequillas de frutos secos, los pasteles de carne congelados, los trocitos de pollo empanizado y los platos de pollo relleno. En los últimos años, los brotes de enfermedades producidas por *Salmonella** han sido vinculados a la contaminación de pepinos, pollo, huevos, pistachos, atún crudo, germinados y muchos otros alimentos. Usted puede enfermarse cuando

come alimentos que están contaminados con *Salmonella*. Los alimentos contaminados generalmente tienen un aspecto y un olor normal, por eso es importante saber cómo prevenir la infección por *Salmonella*. (D'Aoust, 2007)

1.3 TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Los principales avances en los ensayos de detección de patógenos en alimentos, basados en ácidos nucleicos, se produjeron a partir de 1980. Los primeros métodos de identificación molecular fueron la hibridación ADN-ADN, el análisis de secuencias del ADNr 16S, la hibridación con una sonda específica y el análisis RFLP o ribotipificación. En contraste con las características fisiológicas y bioquímicas, la identificación molecular se basa en la composición constitutiva de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión. Estos métodos moleculares se utilizan a menudo en asociación con la identificación microbiológica convencional. (V. & Echeverria, 2014)

El descubrimiento de la PCR, la clonación, la secuenciación y la tecnología de detección por fluorescencia, así como la accesibilidad a una gran cantidad de información en la web ayudó al desarrollo de nuevas herramientas moleculares, cuyo uso ha aumentado enormemente la habilidad para detectar y cuantificar bacterias patógenas en agua y alimentos, entre estas, muchas bacterias emergentes, como por ejemplo; *Escherichia coli* O157, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., las cuales han representado una seria amenaza para la salud pública mundial. La segunda generación de métodos moleculares para la detección e identificación de géneros y especies son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR múltiple, la secuenciación de genes específicos, el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado, entre otros. (V. & Echeverria, 2014)

Recientemente, se ha dado un paso hacia las plataformas moleculares más sofisticadas para la identificación de microorganismos patógenos, incluyendo sistemas de amplificación *in vitro* en tiempo real, biosensores y microarreglos, los cuales han sido desarrollados o se están desarrollando para su uso como métodos rápidos en la detección de patógenos en alimentos. Algunos de los actuales métodos de detección molecular pueden ser empleados, además, en laboratorios o establecimientos clínicos, en sitios de observación, tales como la granja o el campo, en forma de kit todo en uno. (V. & Echeverria, 2014)

1.3.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. En este caso, los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis. Si se desea obtener ácidos nucleicos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados. Los contaminantes capaces de inhibir el análisis PCR se enumeran en la tabla 5. Con objeto de evitar los falsos negativos debidos a la presencia de inhibidores de la PCR en la muestra, se recomienda vivamente efectuar un experimento de control de la inhibición de la PCR, que suele hacerse mediante PCR específica de vegetales (eucariotas o cloroplastos) o de la especie.

Inhibidor	Concentración de inhibición
Dodecilsulfato sódico	> 0,005 %
Fenol	> 0,2 %
Etanol	> 1 %
Isopropanol	> 1 %
Acetato de sodio	> 5 mM
Cloruro de sodio	> 25 mM
EDTA	> 0,5 mM
Hemoglobina	> 1 GM/ml
Heparina	> 0,15 UI/ml
Urea	> 20 mM
Mezcla de reacción	> 15 %

Tabla Inhibidores de la PCR. (V. & Echeverria, 2014)

Los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar, por ejemplo, análisis específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

- Determinar la presencia de genes marcadores en Organismos Genéticamente Modificados (GMO).
- Determinar la presencia de mutaciones asociadas a enfermedades genéticas
- Detectar la presencia de ADN o ARN perteneciente a microorganismos o virus

Métodos de extracción

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo (un tejido, por ejemplo), pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico diana. Entre los procedimientos usuales de lisis figuran los siguientes:

- Rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica, etc.)

- Tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles, etc.)
- Digestión enzimática (Proteinasa K, etc.).

Es posible romper la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares al mismo tiempo. Por ejemplo, una misma solución puede contener detergentes que solubilicen las membranas celulares y sales caotrópicas fuertes que inactiven las enzimas intracelulares. Tras la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación. (V. & Echeverria, 2014)

Métodos de purificación

Los métodos empleados para purificar los ácidos nucleicos de extractos celulares suelen ser combinaciones de dos o más técnicas de las siguientes:

- Extracción/precipitación
- Cromatografía
- Centrifugación
- Separación por afinidad.

Extracción/precipitación

A menudo se efectúa una extracción con disolventes para eliminar los contaminantes de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, suele emplearse una combinación de fenol y cloroformo con objeto de eliminar las proteínas. Para concentrar los ácidos nucleicos suele realizarse una precipitación con isopropanol o etanol. Si la cantidad de ácido nucleico diana es escasa, puede añadirse a la mezcla un portador inerte (como el glucógeno) para favorecer la precipitación. También puede realizarse

una precipitación selectiva con concentraciones salinas elevadas (precipitación salina) o una precipitación de las proteínas mediante cambios del pH.

Cromatografía

Pueden emplearse diversas técnicas cromatográficas de separación: permeación sobre gel, intercambio iónico, adsorción selectiva o unión por afinidad. La permeación sobre gel aprovecha las propiedades de las partículas porosas del gel para tamizar moléculas. Se emplea una matriz con poros de tamaño definido, que dejan pasar las moléculas más pequeñas por difusión, pero no las más grandes, que quedan eluidas en el volumen vacío. Así pues, las moléculas quedan eluidas por orden de tamaño decreciente. La cromatográfica de intercambio iónico es otra técnica, que se basa en la interacción electrostática de la molécula diana con un grupo funcional de la matriz en columna. Los ácidos nucleicos (polianiones lineales con fuerte carga negativa) pueden eluirse de las columnas de intercambio iónico con simples Tampones salinos. En la cromatografía de adsorción, los ácidos nucleicos se fijan selectivamente en sílice o vidrio, en presencia de determinadas sales (por ejemplo, sales caotrópicas), mientras que otras moléculas biológicas no se fijan. A continuación, los ácidos nucleicos pueden eluirse con agua o un tampón hiposalino y se obtiene una muestra que puede emplearse directamente en las aplicaciones posteriores. (Chan, 2002)

Centrifugación

La centrifugación selectiva constituye un método de purificación eficaz. Así, por ejemplo, la ultracentrifugación en gradientes autogenerados de CsCl con fuerzas g elevadas se lleva empleando mucho tiempo para purificar plásmidos. La centrifugación suele asociarse a otros métodos, como la cromatografía de columna centrifugada, en cuyo caso se combina la permeación sobre gel y la centrifugación para separar el ADN o ARN de contaminantes más pequeños (sales, nucleótidos, etc.), intercambiar tampones o seleccionar según el tamaño. Algunos procedimientos combinan la adsorción selectiva en matriz cromatográfica (véase el apartado anterior «Cromatografía») y la elución por centrifugación para purificar de forma selectiva un tipo de ácido nucleico.

Separación por afinidad

En los últimos años, cada vez son más los métodos de purificación que combinan la inmovilización por afinidad de ácidos nucleicos y la separación magnética. Por ejemplo, los ARNm poli A + pueden unirse a partículas magnéticas revestidas de estreptavidina mediante oligo dT marcados con biotina, y el complejo de partículas puede eliminarse de la solución (y de los contaminantes libres) con un imán. Esta técnica en fase sólida simplifica la purificación de los ácidos nucleicos, pues permite sustituir las etapas de centrifugación, extracción orgánica y separación de fases por una operación de separación magnética, única y rápida. (V. & Echeverria, 2014)

Método de extracción y purificación con CTAB

El protocolo del método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) fue elaborado por Murray y Thompson en 1980 y publicado posteriormente, en 1987, por Wagner y sus colaboradores. El método es adecuado para extraer y purificar ADN de vegetales y alimentos derivados de vegetales.

YANITZA SOLEDAD BOHÓRQUEZ MENDOZA TESIS PROFESIONAL

y está especialmente indicado para eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos, que, de otro modo, alterarían la pureza del ADN y, por tanto, su calidad. Este procedimiento se ha aplicado con frecuencia en genética molecular de los vegetales y ha sido probado en ensayos de validación para detectar OGM). Se han elaborado algunas variantes adicionales para adaptar el método a una amplia gama de matrices de alimentos transformados o sin transformar.

Principios del método del CTAB: lisis, extracción y precipitación

Las células vegetales pueden lisarse con el detergente iónico bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB), que forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos en medio hiposalino. De ese modo, los polisacáridos, los compuestos fenólicos y los demás contaminantes permanecen en el sobrenadante y pueden eliminarse por lavado. El complejo de ADN se solubiliza aumentando la concentración salina y se precipita con etanol o isopropanol. En esta sección se describirán los principios de las tres etapas principales: la lisis de la membrana celular, la extracción del ADN genómico y su precipitación. (V. & Echeverria, 2014)

Lisis de la membrana celular: Tal como se ha mencionado anteriormente, la primera etapa de la extracción del ADN es la rotura de la membrana celular y nuclear, para lo cual la muestra homogeneizada se trata primero con el tampón de extracción, que contiene EDTA, Tris-HCl y CTAB. Todas las membranas biológicas presentan la misma estructura general, integrada por moléculas de lípidos y de proteínas, unidas por interacciones no covalentes.

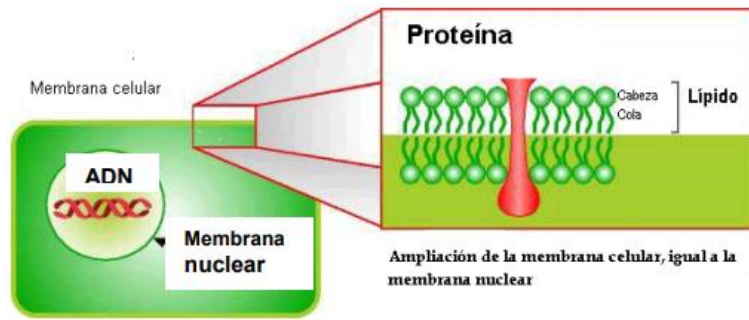


Ilustración 1. Representación simplificada de las membranas celulares (V. & Echeverria, 2014)

Tal como muestra la ilustración 1, las moléculas lipídicas están ordenadas en una doble capa continua, en la que las moléculas proteínicas están «disueltas». Las moléculas lipídicas están formadas por extremos hidrófilos, denominados «cabezas», y extremos hidrófobos, denominados «colas». En este método, el detergente (CTAB) contenido en el tampón de extracción provoca la lisis de la membrana. Dado que la composición de los lípidos y del detergente es similar, el componente de CTAB del tampón de extracción captura los lípidos que integran la membrana celular y nuclear. La ilustración 2 muestra el mecanismo de solubilización de los lípidos con un detergente.

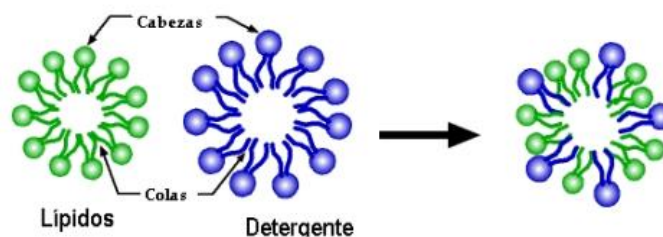


Ilustración 2. Solubilización de los lípidos. (V. & Echeverria, 2014)

La ilustración 3 muestra cómo se libera el ADN genómico cuando el detergente captura los lípidos y las proteínas al entrar en contacto la membrana celular y el tampón de extracción con CTAB. Con una concentración salina (NaCl) determinada, el detergente forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos. El EDTA es un componente quelante, que se une al magnesio, entre otros metales. El magnesio es un cofactor de la desoxirribonucleasa. Al unir el magnesio al EDTA, la actividad de la desoxirribonucleasa presente disminuye. El Tris-HCl confiere a la solución la capacidad de amortiguar el pH (un pH inferior o superior daña el ADN). Es importante señalar que, como los ácidos nucleicos se degradan fácilmente en esta fase de la purificación, debe reducirse al mínimo el tiempo transcurrido entre la homogeneización de la muestra y la adición de la solución tampón con CTAB. Una vez que se han roto las membranas de la célula y de los orgánulos (como los que se encuentran alrededor de las mitocondrias y los cloroplastos), se purifica el ADN.

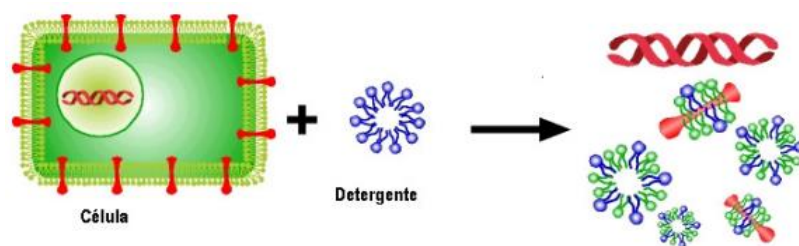


Ilustración 3. Rotura de la membrana celular y extracción del ADN genómico. (V. & Echeverría, 2014)

Extracción: En esta etapa, se separan los complejos formados por los ácidos nucleicos y el CTAB de los polisacáridos, los compuestos fenólicos, las proteínas y los demás lisados celulares disueltos en la solución acuosa. Es especialmente importante eliminar los polisacáridos y los compuestos fenólicos, pues pueden inhibir numerosas reacciones enzimáticas. En concentraciones hiposalinas ($\text{NaCl} < 0,5 \text{ M}$), los contaminantes de los complejos de ácidos nucleicos no precipitan y pueden eliminarse extrayendo la solución acuosa con cloroformo. El cloroformo desnaturaliza las proteínas y facilita la separación de las fases acuosa y orgánica. La fase acuosa suele constituir la fase superior. No obstante, si dicha fase es densa debido a la concentración salina ($> 0,5 \text{ M}$), formará la fase inferior. Además, si el pH de la solución acuosa no se ha equilibrado debidamente (pH 7,8 – 8,0), los ácidos nucleicos tenderán a repartirse en la fase orgánica. Si es preciso, la extracción con cloroformo se realizará dos o tres veces, con objeto de eliminar por completo las impurezas de la capa acuosa. Para perfeccionar la extracción de los ácidos nucleicos, puede retroextraerse la fase orgánica con una solución acuosa, que se añade a continuación al extracto anterior. Una vez purificados los complejos de ácidos nucleicos, puede procederse a la precipitación, última etapa del procedimiento. (Burtin, 2005)

Precipitación: En esta última etapa se separan los ácidos nucleicos del detergente, para lo cual la solución acuosa se trata primero con una solución de precipitación compuesta por una mezcla de CTAB y NaCl en concentración elevada ($\text{NaCl} > 0,8 \text{ M}$). Una alta concentración salina es necesaria para que se forme un precipitado de ácidos nucleicos. Puede ser preferible emplear acetato de sodio en lugar de NaCl por su capacidad tampón. En estas condiciones, el detergente, que es más soluble en alcohol que en agua, puede eliminarse por lavado, mientras

que los ácidos nucleicos precipitan. El posterior tratamiento con etanol al 70 % permite una mayor purificación o elución de los ácidos nucleicos de la sal residual. (Burtin, 2005)

Cuantificación del ADN mediante espectrofotometría

El ADN, el ARN, los oligonucleótidos e incluso los mononucleótidos pueden cuantificarse directamente en soluciones acuosas, en forma diluida o sin diluir, midiendo la absorbancia A (o densidad óptica, DO) de luz ultravioleta (también puede hacerse en el intervalo visible). Si la muestra es pura, es decir, no contiene cantidades significativas de contaminantes como proteínas, fenol o agarosa, la medición espectrofotométrica de la irradiación ultravioleta absorbida por las bases es sencilla y exacta. En este método, los tampones acuosos con escasa concentración iónica (por ejemplo, tampón TE) resultan idóneos. La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo a 260 nm y comparando con un blanco. La interferencia de contaminantes puede determinarse calculando un «cociente». Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A_{260}/A_{280} para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Una absorción a 230 nm significa que la muestra está contaminada con hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias. El cociente A_{260}/A_{230} de las muestras puras es de 2,2 aproximadamente. Cuando la cantidad disponible de ácidos nucleicos es escasa, puede emplearse el método de la placa de agarosa con bromuro de etidio. Permite calcular la cantidad de ácidos nucleicos a partir de la intensidad de la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio irradiado con luz UV, comparándola con unos patrones de concentración.

Principios de la cuantificación de ADN por espectrofotometría

El espectrofotómetro se funda en la transmisión de la luz a través de una solución para determinar la concentración de un soluto presente en la misma. El aparato funciona conforme a un principio sencillo: se irradia una muestra con una radiación luminosa de longitud de onda conocida y se mide la energía luminosa transmitida con una célula fotoeléctrica situada detrás de la muestra. Tal como muestra la figura 4, el espectrofotómetro de haz único consta de una fuente luminosa, un prisma, un recipiente con la muestra y una célula fotoeléctrica. Los distintos elementos están conectados a los sistemas eléctricos o mecánicos adecuados para controlar la intensidad luminosa y la longitud de onda y para convertir en variaciones de tensión la energía recibida en la célula fotoeléctrica. Las variaciones de tensión se miden en un contador o se registran en un ordenador para su posterior análisis.

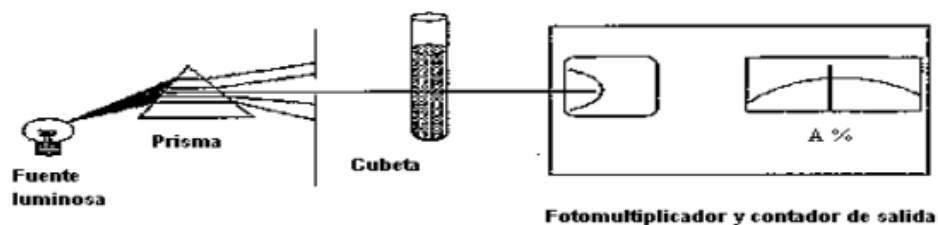


Ilustración 4. Representación esquemática de la transmisión de la luz. (Chan, 2002)

Cada molécula absorbe la energía radiante a una longitud de onda específica, a partir de la cual es posible extrapolar la concentración de un soluto en una solución. Con arreglo a la ley de Lambert-Beer, existe una relación lineal entre la absorbancia A (también denominada densidad óptica, DO) y la concentración de la macromolécula, conforme a la ecuación siguiente:

$$A = DO = \epsilon lc$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción molar, c es la concentración y l es el paso de luz de la cubeta. Las proteínas y los ácidos nucleicos absorben la luz en el intervalo ultravioleta, a longitudes de onda comprendidas entre los 210 y los 300 nm. Tal como se ha señalado anteriormente, la absorbancia máxima de las soluciones de ADN y ARN corresponde a 260 nm y la de las soluciones de proteínas, a 280 nm. Dado que las soluciones de ADN y ARN absorben parcialmente la luz a 280 nm y las que contienen proteínas hacen lo propio a 260 nm, el cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm (A_{260}/A_{280}) proporciona una estimación del grado de pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes A_{260}/A_{280} respectivos del ADN y el ARN puros son aproximadamente de 1,8 y 2,0. Con un paso de luz de 10 mm y una longitud de onda de 260 nm, una absorbancia $A = 1$ corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN bicatenario, 37 $\mu\text{g/ml}$ de ADN monocatenario, 40 $\mu\text{g/ml}$ de ARN o 30 $\mu\text{g/ml}$ de oligonucleótidos. Si la muestra también contiene proteínas, el cociente A_{260}/A_{280} será considerablemente inferior a dichos valores y no podrá determinarse con exactitud la cantidad de ácidos nucleicos. Debe precisarse que la espectrofotometría no permite identificar de forma fiable impurezas de ARN presentes en las soluciones de ADN. Puede emplearse la absorbancia a 325 nm para poner de manifiesto la presencia de restos en la solución o la suciedad de la cubeta.

Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

Elección de la cubeta.

La cantidad de solución de ácidos nucleicos necesaria para medir la absorbancia A depende de la capacidad de la cubeta. Debe elegirse una cubeta apropiada atendiendo al intervalo de concentración de la muestra, el factor de dilución y el volumen de la muestra. En la mayor parte de los procedimientos empleados para detectar OGM, el volumen de ADN genómico disponible

varía entre 50 y 100 μl . Para la cuantificación espectroscópica de pequeños volúmenes de ácidos nucleicos se emplean diversos tipos de cubetas de microvolumen, cuya capacidad oscila entre 5 y 70 μl .

Preparación.

Para calibrar el espectrofotómetro es importante:

- Establecer el paso de luz correcto
- Establecer el factor correcto (ADN bicatenario, ADN monocatenario o ARN)
- Medir la solución en blanco (establecer la referencia), que será agua o solución tampón ($A_{260} = 0$)
- Cerciorarse de que la referencia establecida se renueva periódicamente; • medir una cantidad conocida de ácidos nucleicos puros para comprobar la fiabilidad de la referencia establecida.

Medición en una muestra desconocida.

Para medir la concentración, se utilizan cantidades determinadas de solución de ADN en función de la capacidad de la cubeta empleada (por ejemplo, 5 μl de ADN diluidos en 195 μl de agua si la capacidad de la cubeta es inferior a 0,2 ml). Después de calibrar el espectrofotómetro y de añadir la solución de ácidos nucleicos, se tapa la cubeta, se mezcla la solución y se mide la absorbancia. Con objeto de reducir los errores de pipeteado, debe efectuarse la medición al menos dos veces y siempre con 5 μl de solución de ADN, como mínimo. Se desaconsejan los valores de A_{260} inferiores a 0,02 o comprendidos entre 1 y 1,5 (según el instrumental empleado) por el elevado margen de error que entrañan. La concentración c de un ácido nucleico determinado presente en una solución se calcula conforme a las ecuaciones siguientes:

- ADN monocatenario: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.027$
- ADN bicatenario: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.020$
- ARN monocatenario: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}/0.025$
- Oligonucleótido: $c(\text{pmol}/\mu\text{l}) = A_{260}100/1.5NA+0.71NC+1.20NG + 0.84NT$ donde A260 es la absorbancia medida a 260 nm.

El cuadro 2 recoge un ejemplo de los valores de la absorbancia de ADN de timo de ternera muy purificado, en suspensión en un tampón TNE 1x, considerando que el ADN de referencia es ADN bicatenario, con una $A_{260} = 1$ a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en una cubeta cuyo paso de luz es de 10 mm. La concentración nominal de ADN era de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Longitud de onda	Absorbancia	A_{260}/A_{280}	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
325	0,01	-	-
280	0,28	-	-
260	0,56	2,0	28
230	0,30	-	-

Tabla 4. Valores de la absorbancia de ADN de timo de ternera muy purificado, en tampón TNE 1x.

1.3.2 REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada. Con esta técnica se pueden producir un billón de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas. (Hanna & Wang, 2005)

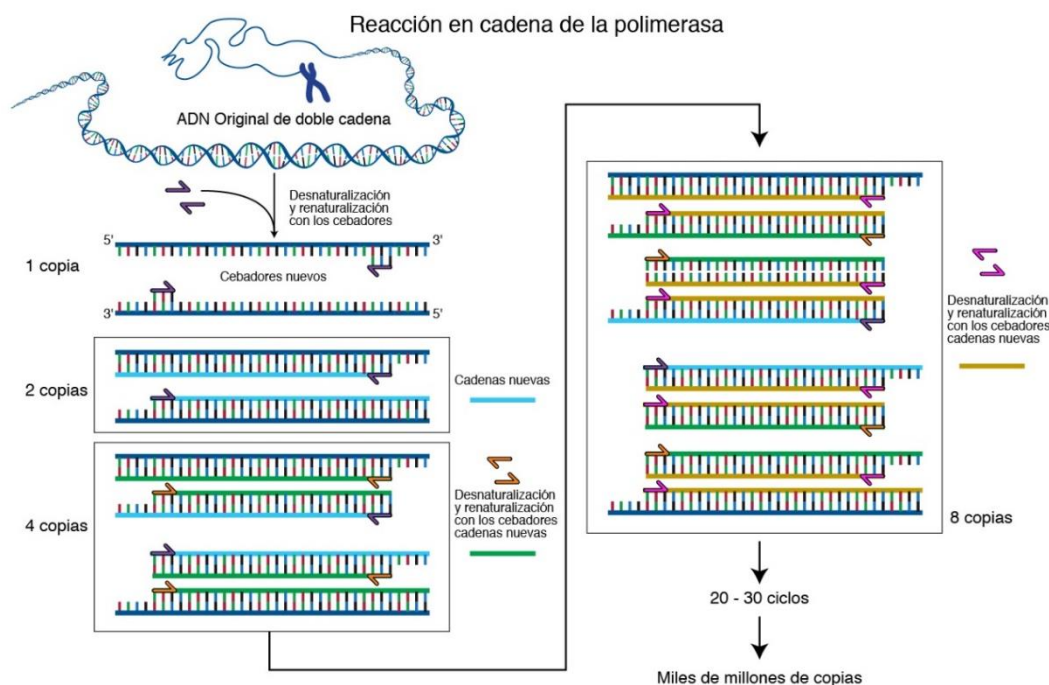


Ilustración 5. Reacción en cadena de polimerasa

PCR, o la reacción en cadena de la polimerasa, es una reacción química que los biólogos moleculares utilizan para amplificar (crear copias) fragmentos de ADN. Esta reacción permite que unos pocos fragmentos de ADN se repliquen en millones o miles de millones de copias. La amplificación del ADN nos permite estudiar la molécula del ADN en detalle en el laboratorio.

Para amplificar un segmento de ADN utilizando la RCP, primero se calienta la muestra para la desnaturalización del ADN, es decir para que se separe en dos segmentos de una sola hebra de ADN. Luego, una enzima llamada "polimerasa Taq" sintetiza - construye - dos nuevas hebras de ADN, utilizando las hebras originales como plantillas. Este proceso resulta en la duplicación del ADN original, en la que cada una de las nuevas moléculas contiene una hebra vieja y una hebra nueva de ADN. Entonces, cada una de estas hebras puede usarse para crear dos copias nuevas, y así sucesivamente. El ciclo de la desnaturalización y síntesis del nuevo ADN se repite tantas como 30 o 40 veces, dando lugar a más de mil millones de copias exactas del segmento de ADN original. (Chan, 2002)

El proceso de ciclado completo de la RCP es automático y puede completarse en tan sólo unas pocas horas. El proceso es dirigido por una máquina llamada termociclador, que está programada para cambiar la temperatura de la reacción cada pocos minutos para hacer posible la desnaturalización y síntesis del ADN.

1.3.3 IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEOTIDOS POR ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica que emplean los científicos en el laboratorio utilizada para separar el ADN, el ARN, o moléculas o proteínas en base a su tamaño y carga eléctrica. Se utiliza una corriente eléctrica para mover las moléculas y que se separen a través de un gel. Los poros del gel actúan como un colador, permitiendo que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las grandes. Las condiciones utilizadas durante la electroforesis se pueden ajustar para separar moléculas en el rango de tamaño que se desee. (Harris & Zagory, 2002)

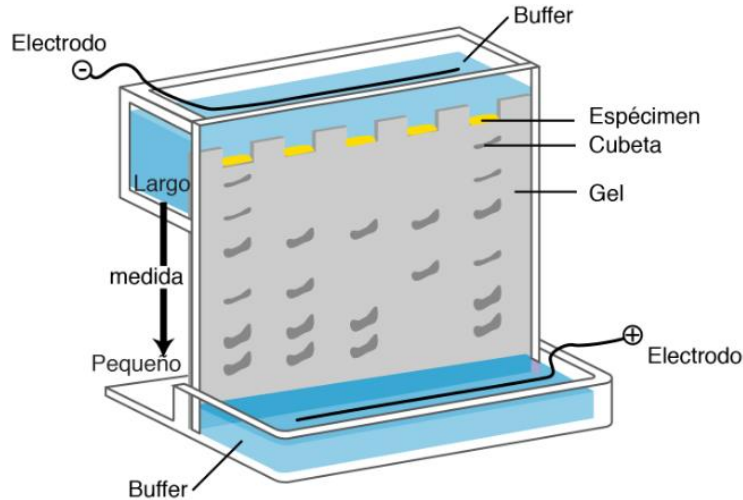


Ilustración 6. IDENTIFICACIÓN DE POLINUCLEOTIDOS POR ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica que se utiliza de forma generalizada en la que, fundamentalmente, se aplica corriente eléctrica a moléculas biológicas, ya sean ADN, proteínas o ARN..., y se separan en función de si son más grandes o más pequeñas. Se utiliza en una gran variedad de aplicaciones... como en medicina forense para determinar la identidad de las personas que puedan haber participado en un delito, mediante la vinculación de su patrón de ADN -su patrón de electroforesis- a uno que esté en una base de datos. El proyecto genoma humano se llevó a cabo con algo que se llama electroforesis capilar, mediante la separación de ADN en piezas más cortas y su separación en geles de electroforesis que permite a los patrones de A, C, T y G ser caracterizados. También son muy importantes en la investigación de proteínas, y en la investigación de mutaciones genéticas, porque cuando las proteínas o el ADN están mutados, son con frecuencia más o menos largos, y por lo tanto, aparecen en un gel de electroforesis de manera diferente de lo normal. Las pruebas de diagnóstico para muchos casos todavía se realizan mediante electroforesis. Es una técnica muy utilizada en la investigación básica, muy importante para la comprensión de la función de genes y proteínas, pero ahora ha irrumpido en el área de diagnóstico clínico y forense. Una

electroforesis se realiza generalmente en una especie de caja que tiene una carga positiva en un extremo y una carga negativa en el otro. Y como todos aprendimos en las clases de física, cuando se pone una molécula cargada en un entorno así, las moléculas negativas van a la carga positiva, y viceversa. Al analizar las proteínas en un gel, en una de estas cajas, por lo general se toma la proteína completa para ver lo grande que es. Cuanto más corta, más migran en el gel, de modo que las proteínas pequeñas terminará en la parte inferior del gel, porque han ido más lejos, y las más grandes terminarán quedándose en la parte superior. En el caso del ADN, el ADN es una molécula muy larga, así que no se puede hacer un gel de una molécula entera de ADN de una célula. Es tan grande que nunca se metería en el gel, así que lo que hacen los científicos es cortar el ADN con cosas como las enzimas de restricción, que cortan el ADN en pedazos más manejables, y entonces esas piezas, dependiendo de lo grande que sean, migran más o menos por el gel y terminan más arriba o más abajo. (Harris & Zagory, 2002)

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

Microorganismos de referencia

Cepas de *Salmonella* spp, se obtendrán de la Colección Nacional de Cepas Microbianas Y Cultivos Celulares del CINVESTAV- IPN unidad Ciudad de México. Estas cepas se propagarán en medios de cultivo sólidos apropiados para cada especie y se almacenarán a 4°C durante 16-20 h. Se prepararán cultivos mediante la inoculación de una colonia independiente de cada cepa en 5 ml de medio líquido apropiado a 37°C con agitación a 250 rpm durante 24 h. El crecimiento celular se estimará mediante la medición de la absorbancia a 600 nm, y las concentraciones reales se determinarán realizando cultivo de las diluciones (NaCl 0.85%) en los medios apropiados.

Obtención de las muestras

Se adquirirán muestras de los productos cárnicos procesados de marcas nacionales en supermercados en la ciudad de Oaxaca de Juárez. Se incluirán los productos de mayor consumo nacional, incluyendo jamones, salchichas y chuleta de cerdo ahumada. Similarmente, se adquirirán muestras de productos cárnicos procesados tradicionales en los mercados de la ciudad para ser incorporados en el estudio. En este caso se incluirán productos como salchichas oaxaqueñas, morongas y queso de puerco. Los productos serán colocados en bolsas estériles, etiquetadas y colocadas en hieleras a una temperatura de 4-8 °C y serán procesadas en un lapso máximo de 2 h después de su traslado al laboratorio.

Análisis bacteriológicos

La detección de *Salmonella* se realizará sobre una muestra de 25g que se diluirá 1:10 en caldo lactosado, el cual se incubará durante 24h a 35°C. Una alícuota de este cultivo se transferirá a un tubo con 10 ml con caldo tetrationato, que se incubará bajo condiciones similares a las descritas en el paso anterior. Después de la incubación, se tomarán asadas del cultivo las cuales se sembrarán por estriado en cajas de agar sulfito bismuto y se incubarán a una temperatura de 35°C durante 24h. Finalmente, una pequeña porción de las colonias sospechosas se sembrará por punción en tubos conteniendo medio inclinado de agar triple azúcar hierro. Al cabo de 24h, las colonias positivas se detectarán por los cambios bioquímicos observados en los tubos (SSA, 2015). (SSA, 2015).

La Tabla 7 muestra los primers y sondas correspondientes a las 2 especies que serán sintetizados para su utilización en este estudio (Chiang y col., 2012). Los primers serán analizados en el programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) para establecer sus temperaturas de alineamiento y especificidad.

Fragmento de DNA			Producto de PCR
(N° GeneBank)	Primers	Secuencia de oligonucleótidos	
Salmonella spp. AM933172	Ssp1S/Ssp1A	F5'TTGCGTTGCGTCTGTCC3'	237 pb
		R5'GCTTATCGTCTGCGGCTC3'	
		Sonda5'TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGCG	
		ATAGTACGGCCATT3'	

Tabla 5 Iniciador utilizado para evaluar la población bacteriana. Fuente: Chiang y col., 2012.

Extracción de ADN genómico de las cepas

Se utilizará el método de extracción de ADN de Birnboim y Doli (1979). El caldo de cultivo con una colonia independiente cultivada durante 12 h se dividirá en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugará 3 min a 12000 rpm y se decantará el sobrenadante. Se agregarán 110 µl de solución salina P1 (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0) más 3 µl de RNAsa (20 mg/ml) y se suspenderá la pastilla, se adicionarán 110 µl de solución P2 (NaOH 0.2 N, SDS 1%, preparar al instante), mezclando por inversión lentamente 4 veces y finalmente se agregarán 135 µl de solución P3 (60 ml CH₃COOK 5 M, 11.5 ml CH₃COOH glacial, 28.5 ml agua) agitando por inversión. Para la separación de proteínas, se incubará por 10 minutos a temperatura ambiente y se adicionará 200 µl de cloroformo a 4°C, se mantendrá en agitación hasta formar un precipitado blanco y se llevará a centrifugación por 10 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante será recuperado en un tubo de 1.5 ml y se depositará un volumen de isopropanol a -20°C agitando por inversión. Se centrifugará por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante será desechado, se agregarán 500 µl de etanol al 70% y se agitará para disolver la pastilla formada, se centrifugará 5 minutos a 12,000 rpm, se decantará y se dejará secar por 10 minutos. El ADN se almacenará a -20 ° C y será diluido con agua libre de nucleasas. La pureza del ADN se determinará estableciendo la relación de absorbancia 260/280 entre un rango de 1.8 – 2.0. La integridad se evaluará utilizando un gel de agarosa al 2%.

Tratamiento de las muestras de productos cárnicos

El análisis de muestras de leche se realizará mediante el protocolo de extracción de ADN de *E. coli* O157 y *L. monocytogenes*, descrito por Paul y colaboradores (Paul y col., 2013; Paul y col., 2015). En tubos de centrifuga de 15ml se agregarán 10 ml de una solución (25 ml de leche en 25 ml de agua destilada). Se añadirán 800 μ L de EDTA 0.5 M y se mantendrá a 40°C durante 5 min. Las diluciones de bacterias (50 μ L) serán agregadas a la suspensión calentada y se mezclarán por inversión. La muestra será centrifugada durante 15 min a 4,700 xg a temperatura ambiente. La capa de grasa se eliminará por aspiración en todas las muestras. Se recolectarán 50 μ L de sobrenadante con una punta limpia. El sedimento se resuspenderá en 450 μ L de buffer de lisis (SDS 0.1%, NaCl 30 mM, MgCl₂ 2mM) por pipeteo y será transferido a un tubo de microcentrífuga que contendrá ADNasa I (2 ml de 500 U/ml en Tris 10 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 2mM, pH 7.5), y se incubará durante 5 min. El tubo será centrifugado durante 2 minutos a 15,000 xg. El sobrenadante se eliminará por aspiración y el sedimento se resuspenderá por pipeteo en 100 μ L de PS (NaCl 0.85%) con EDTA 1 mM. Se agregará tripsina (5 ml de 2 mg/ml en buffer de fosfatos) a las muestras y se incubarán durante 5 minutos a temperatura ambiente con mezclado periódico. Se añadirán 400 μ L de PS + T (NaCl 0.85% + Tween 20 0.1%) y el tubo se centrifugará durante 2 minutos a 15,000 xg. El sobrenadante será eliminado por aspiración.

Extracción de ADN mediante reactivos HotShot

A tubos de 0.6 ml con <5 µL de muestra, se añadirá 5 µL de HS + T [reactivo HotShot (NaOH 25 mM + Na₂EDTA 0.2mM, pH 12.0) + Tween 20 0.1%] de concentración 5X. El tubo se centrifugará ligeramente para sedimentar los sólidos, después de lo cual se mezclarán los contenidos del tubo por agitación. La muestra se calentará durante 5 min a 95°C. y se enfriará rápidamente a 20°C. Se añadirá un volumen de 5 µL HS neutralizador (Tris-HCl 40 mM, pH 5.0) de concentración 5X, se centrifugará para sedimentar los sólidos, después de lo cual se mezclará por agitación. Este material será utilizado para los procedimientos de la PCR. Por otra parte, se evaluará la extracción de ADN utilizando 10 µL de la solución de extracción QuickExtract™ + 0.1 µL de lisozima (Ready-lyse lysozyme solution) sobre una muestra de 2 µL. El contenido de los tubos se mezclará por agitación y se incubará a temperatura ambiente durante 15 min, después de lo cual se calentará a 80°C durante 1-10 min. Los contenidos se utilizarán para las determinaciones de la PCR.

PCR estándar

Se realizarán ensayos de PCR para evaluar la calidad de ADN extraído de las bacterias control. Se optimizarán gradientes de temperatura y concentración de primers. Como control positivo de amplificación se utilizará una muestra de ADN genómico de E-coli DH5?. La Tabla 2 muestran las concentraciones finales de los reactivos para amplificación de muestras de DNA de leche a evaluar las cuáles serán programadas en un termociclador (Labnet, modelo Multigene Gradient TC9600-G) utilizando los primers sintetizados y el ADN genómico correspondientes a cada microorganismo.

COMPONENTE	20 μ l/ RXN	CONCENTRACIÓN FINAL
H ₂ O	7.4 μ L	
2X Phusion Flash PCR Master Mix	10 μ L	1X
Primer Fw	0.8 μ L	0.5 μ M
Primer Rw	0.8 μ L	0.5 μ M
ADN de plantilla	1 μ L	1pg–10 ng

Tabla 6 Componentes de reacción de PCR

Con el objetivo de amplificar de manera óptima la secuencia se realizarán gradientes de temperatura de 55°C a 67°C. La temperatura teórica de la amplificación será tomada de acuerdo a la temperatura de metilación de los primers sintetizados. Las instrucciones de ciclado se exponen en la tabla 9 y se realizará de acuerdo a las instrucciones del proveedor de la enzima.

Análisis electroforético

Esta técnica será empleada para analizar resultados de reacciones de alineamiento, integridad de ADN y productos de la PCR. Las concentraciones de los geles empleados se realizarán entre 0.7% y 2%, y serán preparados en buffer TAE 1X (40mM Tris, 20mM ácido acético, 1mM EDTA, pH=8). Como marcador de peso molecular se utilizará GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Se empleará como buffer de corrida TAE 1X, y un voltaje de 90V por 1 hora. Las muestras serán tratadas con distintos volúmenes de Buffer de carga 6X y Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración 0.04 μ g/ml y serán observadas mediante un transiluminador con una longitud de onda de 302 nm.

PCR en tiempo real

PASO DEL CICLO	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización Inicial	98	10 s	1
Desnaturalización	98	10 s	30
Alineamiento	63.5	10 s	30
Extensión	72	15 s/ kb	30
Extensión final	72	1 min	1

Tabla 7 Condiciones de reacción de ciclado establecida para evaluar los iniciadores.

Se emplearán dos conjuntos 5' y 3' de primers /sonda de nucleótidos para la detección de bacterias patógenas. Las sondas y los primers se enviarán a sintetizar a una empresa biotecnológica y serán adquiridos 5 nmoles de primerdirecto, 5 nmoles de primer inverso y 2.5 nmoles sonda. La reacción se realizará con 10 µL de mezcla maestra TaqMan Fast Mezcla ,1 µL primer/sonda y 9 µL de muestra. Se usará un termociclador StepOne en tiempo real (Applied Biosystems) con activación de 20 s a 95°C y 45 ciclos de 1 s a 95°C, y 20 s a 62°C. Se analizarán los efectos de la concentración de primers y la temperatura de alineamiento de cada una de las muestras con un 1 ng de ADN. Para optimizar las condiciones de PCR se colocarán en tubos de reacción combinaciones de primer/sonda de 250/500 nM o 250/125 nM. La reacción de qPCR utilizará la

mezcla TaqMan Fast Advanced Master (10 ul por reacción), 1 ul de primer/sonda 20X (concentración final de 500/250 nM), y 9 ul de muestra, con rampas de temperatura rápida, activación de 20s a 95°C y 40 ciclos de 3 s a 95°C y 30 s a 60°C. Se realizarán pruebas de inhibición con la mezcla maestra SYBR Green Master Mix con los mismos primers (sin sondas) a 500 nM usando rampas de temperatura rápida, activación de 20s a 95°C, y 40 ciclos de 3 s a 95°C y 30 s a 60° C. Las reacciones serán realizadas en tubos para PCR, los cuales serán mezclados y centrifugados a 1500 xg durante 1 min antes del ciclado térmico. Se prepararán curvas tipo por triplicado de muestras de ADN purificado o extractos de ADN bacteriano. En este último caso, 10-100 ul de cultivo bacteriano incubado durante 12 hrs diluido en PS se añadirá a 400 ul PS + T y 3 ul de DE en tubos de microcentrífuga. Los tubos se centrifugarán a 15000 xg durante 2 minutos, se eliminará el sobrenadante y se extraerá el ADN con HotShot como se describió anteriormente. Todo el extracto se agregará al tubo de PCR para realizar las pruebas correspondientes

RESULTADOS

MUESTRA	TÉCNICA MOLECULAR		MÉTODO CONVENCIONAL		KIT RapidCheck®	
	<i>Salmonella spp</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Carne molida de puerco	Detectable	No detectable	Detectable	No detectable	Positivo	Negativo
Tasajo	Detectable	No detectable	Detectable	No detectable	Positivo	Negativo
Filete de pescado (tilapia)	No detectable	No detectable	No detectable	No detectable	Negativo	Negativo
Camarón	Detectable	No detectable	Detectable	No detectable	Positivo	Negativo
Pollo	Detectable	No detectable	Detectable	No detectable	Positivo	Negativo
Límite permisible	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Tabla 8 Resultados de *Salmonella* y *Listeria* en técnica molecular, método tradicional y kit

En la tabla se pueden observar los resultados si ces detectable las bacterias *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* cada una de las muestras en los tres métodos aplicados.

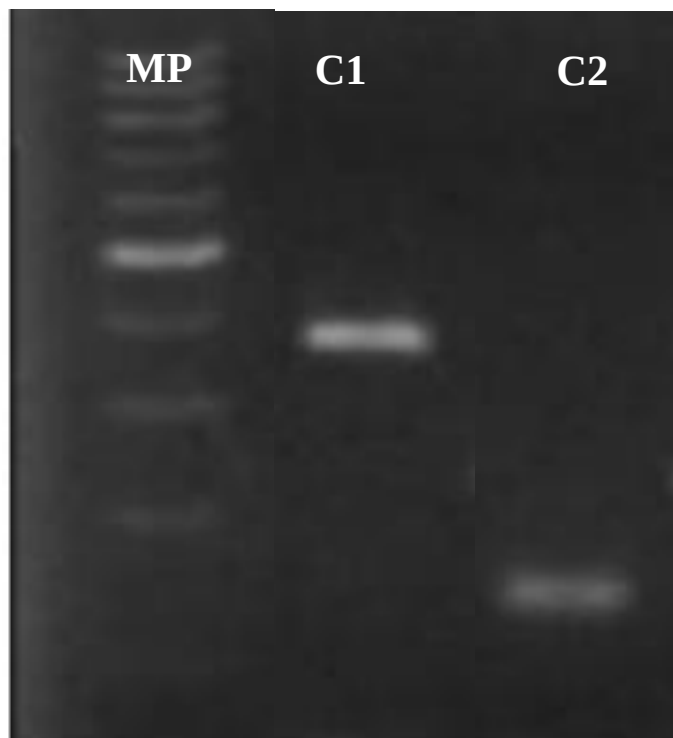


Ilustración 7 Análisis electroforético de productos de PCR para la identificación de microorganismos en muestras microbiológicas. MP) Marcador de peso molecular 100 pb NEB, , C1: L. monocytógenes, y C2: Salmonella spp.

CONCLUSIONES

Con este proyecto pudimos desarrollar una técnica de biotecnología molecular para la detección de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos, ya que esta técnica nos ayuda a detectar la *Salmonella spp* en 4 horas, ya que por el medio tradicional se dilata 5 días para la obtención de *Salmonella spp*.

El método microbiológico convencional para *Salmonella spp* mostró resultados positivos para todas las muestras, a excepción de la muestra de pescado; y resultados negativos en todas las muestras para la detección de *Listeria monocytogenes*.

Mediante el kit comercial para *Salmonella spp* mostró resultados positivos para todas las muestras, a excepción de la muestra de pescado; y resultados negativos en todas las muestras para la detección de *Listeria monocytogenes*.

El método molecular de extracción de ADN directo mediante métodos enzimáticos presentó valores de pureza y calidad dentro del rango esperado. La presencia de los microorganismos de interés se realizó mediante PCR, cuyo análisis en geles de agarosa mostró resultados positivos para los productos cárnicos.

El método de extracción directo ofreció la ventaja de evitar cultivos primarios y obtener resultados altamente confiables en un periodo de 4 horas. La implementación de este método redujo el tiempo de análisis de 5 días por el método microbiológico y 2 días mediante el uso del Kit comercial, a 4 horas por el método molecular.

REFERENCIAS

(s.f.).

Albo, G. A. (2011). *Portafolio educativo en temas clave en Control de la Inocuidad de los Alimentos*. Buenos Aires: Organizacion Panamericana de la Salud.

Arenas, L., Rodas, A., Narvaez, C., Jerez, N., Huerta, N., & Giuffrida, M. y. (2009). Calidad Microbiologica de las Carnes y de los Alimentos. *Agrotecnico No. 25*, 44.

Burtin, S. (2005). *Real-Time PCR In: Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. New York: Marcel Dekker.

Castillo, A., Mercado, I., Lucia, M. L., & Martinez, R. Y. (2004). *Salmonella contamination during production of cantaloupe: a binational study*. USA: J. Food Prot.

Chan, O. W. (2002). Molecular Techniques: An overview. Biotechnology.

D'Aoust, J.-Y. (2007). Especies de Salmonella. En M. Doyle, & a. T. L. R. Beuchart, *Microbiologia de los Alimentos* (págs. 133-163). Acribia S.A, Zaragoza.

Hanna, S. E., & Wang, C. C. (2005). Real-Time polymerase chainreaction for the food microbiologist: technologies, applications and limitations. *Journal of Food Science*, 70(3), 49-53.

Harris, L., & Zagory, D. a. (2002). Safty factors. In: Kader. *University of California*, 301-314.

JE, C. (2004). *Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Clin Microbiol.

NOM-213-SSA1-2018, N. O. (2019). NORMA Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2018, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados y los establecimientos dedicados a su proceso. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. *Diario Oficial de la Federacion* .

V., C.-U., & Echeverria, J. y. (2014). Determinacion por PCR en Tiempo Real de *Escherichia coli*. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 19(1), 44-50.