



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN  
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN DEL RIESGO DE *Salmonella* spp. EN EL  
PROCESAMIENTO DE POLLO DE ENGORDA EN UN RASTRO  
MUNICIPAL DE LEÓN, GUANAJUATO, MÉXICO.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MARTÍNEZ VALDÉS WENDY**

**TUTORA: MVZ, PhD. CASTAÑEDA SERRANO MARÍA DEL PILAR  
COMITÉ TUTORAL: MVZ, MCV. JOSÉ FERNANDO NÚÑEZ ESPINOSA.  
MC. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS**

**MÉXICO, D.F**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**«El pájaro rompe el cascarón.  
El huevo es el mundo.  
El que quiere nacer tiene que romper un mundo.»  
Hesse H.**

## **DEDICATORIAS**

A las luces que iluminan mi camino: Ana y Salvador.

A Cristina, Rocío, Fátima y Ana Lilia.

A Salvador Ian por la instantánea alegría que tu sonrisa me da.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de superarme profesionalmente.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a los investigadores del laboratorio de Microbiología del Departamento de Producción Animal Aves, del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química anexo E y del laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina.

A la PhD. Pilar Castañeda y Dr. Fernando Núñez por depositar su fe en mí y por su amistad.

Al Dr. Carlos Eslava, por su apoyo, su confianza y estímulo para el término de este trabajo. Gracias por hacerme parte de su familia académica y enseñarme que el conocimiento es muy importante pero insuficiente.

A la Dra. Carmen Wachter por la oportunidad de conocerla.

A mis padres por darme la virtud de encontrar alegría en todo lo que hago. Por darme el ejemplo de que la vida se construye con metas, por impulsarme a conseguir mucho más de lo que pudiera proponerme y por enseñarme que lo más importante es el amor, todo lo demás es currículum.

A mis hermanas por enseñarme que el verdadero conocimiento no está en los libros sino en uno mismo. Por ser mis mejores maestras.

A Dios por sus bendiciones y por enseñarme a oír su voz con mi corazón.

Al CONACyT por la beca otorgada.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Análisis de riesgos.....	2
1.2.1 Análisis de Riesgos en el comercio internacional.....	3
1.3 Sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control.....	5
1.4 Criterios microbiológicos.....	6
1.4.1 Programas de muestreo.....	7
1.5 Salmonelosis.....	8
1.5.1 Factores de virulencia y toxinas de <i>Salmonella</i> .....	9
1.6 Métodos para la determinación de microorganismos en los alimentos	10
1.6.1 Método de ELISA.....	11
1.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	11
2. JUSTIFICACIÓN.....	13
3. HIPÓTESIS.....	14
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos específicos.....	14
5. MATERIAL Y METODOS.....	15
5.1 Fase de campo.....	15
5.1.1 Selección de programas de muestreo para <i>Salmonella</i> .....	15
5.1.2 Selección de puntos de muestreo.....	16
5.2 Fase de laboratorio.....	16
5.2.1 Toma y manejo de muestras.....	17
5.2.2 Búsqueda del peligro.....	17
5.2.2.1 ELISA.....	18

5.2.2.2 PCR.....	21
5.2.2.2.1 Extracción de DNA.....	21
5.2.2.2.2 Cuantificación de DNA y evaluación de su pureza.....	22
5.2.2.2.3 Amplificación de los primers phoP, hin y H-li.....	22
6. RESULTADOS.....	24
6.1 Evaluación del riesgo.....	24
6.1.1 Identificación del peligro .....	24
6.1.1.1 Agente etiológico.....	24
6.1.1.2 Identificación cualitativa del peligro.....	25
6.1.1.3 Aplicación del Acta de 90 puntos para la identificación de riesgos en el rastro.....	27
6.1.2 Caracterización del peligro.....	28
6.1.2.1 Caracterización cualitativa del peligro.....	28
6.1.2.2 Dosis – respuesta.....	29
6.1.3 Evaluación de la exposición.....	30
6.1.3.1 Evaluación cualitativa.....	30
6.1.3.2 Evaluación de las condiciones sanitarias del rastro.....	30
6.1.3.3 Evaluación cuantitativa.....	34
6.1.3.3.1 Ensayo de ELISA.....	34
6.1.3.3.2 PCR multiplex.....	34
6.1.3.4 Modelo de evaluación cuantitativa del riesgo.....	35
6.1.4 Caracterización del riesgo.....	36
6.1.4.1 Estimación cuantitativa del riesgo.....	36
6.1.4.2 Riesgos relativos.....	36
7. DISCUSION.....	39
8. CONCLUSIONES.....	50
9. REFERENCIAS.....	52

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Categorías de los programas de muestreo.....	59
Cuadro 2. Tamaño de n y c según las categorías.....	60
Cuadro 3. Determinación de PCC y OP.....	61
Cuadro 4. Descripción de los lotes de canales de aves muestreados	62
Cuadro 5. Primers empleados en la PCR multiplex.....	63
Cuadro 6. Casos de Fiebre Tifoidea, Paratifoidea y otras Salmonelosis en la población general de Estados Unidos Mexicanos.....	64
Cuadro 7. Muestras de canales de aves positivas a <i>Salmonella</i> spp en la PCR multiplex.....	65
Cuadro 8. Matriz para la caracterización cualitativa del peligro.....	66
Cuadro 9. Cepas utilizadas como controles en la PCR.....	67

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo <i>in situ</i> del procesamiento de las aves.....	68
Figura 2. Árbol de decisión para determinar los PCC.....	69
Figura 3. Localización de los PCC y OC en el procesamiento.....	70
Figura 4. Resultados de un inmunoensayo con el kit TECRA.....	71
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con <i>phoP</i> , <i>Hin</i> y <i>H-li</i> de controles positivos 1.....	72
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con <i>phoP</i> , <i>Hin</i> y <i>H-li</i> de controles positivos 2.....	73
Figura 7. Tanque de escaldado.....	74
Figura 8. Desplumado.....	75
Figura 9. Tanque de pintado.....	76
Figura 10. Eviscerado.....	77
Figura 11. Lavado de las canales.....	78
Figuras 12. Resultados de PCR .....	79
Figura 13. Frecuencia de amplificación de los genes <i>phoP</i> , <i>Hin</i> y <i>H-li</i> según etapa del procesamiento.....	80
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes al lote 1, amplificados con <i>phoP</i> , <i>Hin</i> y <i>H-li</i>	81
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes a los lotes 2 y 3, amplificados con <i>phoP</i> , <i>Hin</i> y <i>H-li</i> .....	82
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes a los lotes 3 y 4, amplificados con <i>phoP</i> , <i>Hin</i> y <i>H-li</i> .....	83

Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes a los lotes 4 y 5, amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li*..... 84

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes al lote 5, amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li*... 85

## **Anexos**

Anexo 1. Identificación serológica del control positivo.....	86
Anexo 2. Prueba piloto.....	87
Anexo 3. Acta de 90 puntos.....	90

## RESUMEN

Evaluación del riesgo de *Salmonella* spp. en el procesamiento de pollo de engorda en un rastro municipal de la ciudad de León, Guanajuato, México.

El análisis de riesgo identifica peligros con base a evidencias epidemiológicas. Sus componentes son: evaluación, gestión y comunicación del riesgo. La evaluación de riesgo consta de 4 fases: Identificación y Caracterización del peligro, Evaluación de exposición y Caracterización del riesgo. Con el objetivo de evaluar el riesgo de *Salmonella* spp. en el procesamiento de pollo de engorda en un rastro municipal de León, Gto. Se reunió información epidemiológica y comercial, y se tomaron 80 muestras de canales de aves de 5 diferentes lotes. Se reconocieron Puntos Críticos de Control y Operaciones Críticas (desplumado, pintado, eviscerado y lavado) durante el procesamiento del pollo de engorda, utilizando la prueba de ELISA (TECRA) y PCR multiplex se identificó la presencia de *Salmonella* spp. Los 5 lotes muestreados fueron negativos a *Salmonella* spp. con TECRA. Con PCR, 12 canales (18.8%) fueron positivas a *Salmonella* spp., 31 (48.4%) fueron positivas a las enterobacterias: *E. coli*, *Shigella* y *Citrobacter* y 21 (32.8%) fueron negativas. De las muestras positivas a *Salmonella* spp., 7 muestras (11%) correspondieron al lote 1, 4 (6.3%) al lote 4 y 1 (1.5%) al lote 5. Al aplicarse el Acta de 90 puntos de la COFEPRIS el rastro cumplió en 42.8% con lo establecido en la NOM-120. El modelo bidimensional indica que las canales de pollo positivas a *Salmonella* spp. representan un mediano riesgo para la salud. Además las 4 fases críticas del procesamiento, corroboradas con PCR sustentan lo anterior porque los programa de muestreo de 2 atributos no acepta la presencia de *Salmonella* spp.

Palabras clave: *Salmonella*; pollo de engorda; evaluación de riesgo; procesamiento de pollo.

## ABSTRACT

Risk evaluation of *Salmonella* spp in the poultry processing of broiler chickens in a municipality processing plant in the city of Leon, Guanajuato, Mexico.

The risk analysis identifies hazards based on epidemiological evidences. Its components are: evaluation, proceeding and risk communication. The risk evaluation to consist of 4 phases: Identification and distinguished of the hazard, exposition evaluation and distinguished of the risk. The objective of this study was to evaluate the risk of *Salmonella* spp in the poultry processing of broiler chickens in a municipality processing plant in Leon, Gto. In order to achieve this objective was obtained epidemiological and commercial information moreover 80 carcasses were taken from 5 different flocks. The control critical points and critical operations (defeathering, painted, eviscerated and washed) were recognized during the poultry processing of broiler chickens. Using the ELISA (TECRA) test and PCR multiplex was identified the presence of *Salmonella* spp. The 5 flocks sampled were negatives a *Salmonella* spp using TECRA. Using PCR 12 (18.8%) carcasses were positives to *Salmonella* spp, 31 (48.4%) were positives to enterobacteria: *E.coli*, *Shigella* and *Citrobacter* and 21 (32.8%) were negatives. In the positives samples to *Salmonella* spp., 7 samples (11%) belong to flock 1, and 4 (6.3%) to the flock 4 and 1 (1.5%) to the flock 5. The 90 points act of COFEPRIS the municipality processing plant fulfilled in 42.8% with the stated in the NOM-120. The two-way model showed that the positives carcasses to *Salmonella* spp, stated a medium risk to the health. Besides the 4 critical phases of the poultry processing, confirmed with PCR stated the sustaint it before, because the sampled programs of two attributes it does not accept the presence of *Salmonella* spp.

Key words: *Salmonella*; Broiler chickens; Risk evaluation; Poultry processing.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

El pollo es el producto de origen animal de mayor consumo a nivel mundial, se estima que a través de los años se incrementa debido a la creación de productos con valor agregado y de fácil preparación así como a la tendencia del consumo de productos bajos en grasas y colesterol. La presencia de microorganismos patógenos durante la crianza y procesamiento de las aves, así como durante su transformación y preparación son factores que condicionan la presencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Los microorganismos potencialmente patógenos presentes en los alimentos son *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* entre otros. En muchas ocasiones el peligro de brotes de ETA puede ser eliminado durante la preparación del alimento si éste es manipulado correctamente y cocinado a temperaturas que eliminen el microorganismo, pero en ocasiones los brotes son debidos a una contaminación posterior a su preparación (Richardson, 2001; Codex, 1981<sup>a</sup>).

La importancia de determinar la presencia de microorganismos patógenos en canales de pollo procesadas comercialmente, es la elevada incidencia en los últimos años de enfermedades entéricas transmitidas por el consumo tanto de pollo y sus productos, así como de alimentos como carne, leche y agua. Como se ha mencionado *Salmonella* spp. es uno de los microorganismos asociados con brotes de ETA y las pérdidas económicas son altas. Lo anterior plantea la necesidad establecer diferentes medidas de prevención a nivel de granja y procesamiento para evitar la contaminación de las canales de pollo. Las ETA tienen especial importancia cuando afectan grupos especialmente susceptibles (niños, personas inmunosuprimidas y adultos mayores) (OMS, 1998; ICMSF, 1999).

## 1.2 Análisis de riesgos

El análisis de riesgos es un instrumento que ayuda a evaluar la severidad de los peligros sobre la inocuidad de los alimentos. Éste además valora la probabilidad de que dichos peligros se presenten durante la producción, procesamiento, distribución, almacenamiento y preparación del alimento (OMS, 1998; Kenneth *et al*, 1999). El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control (HACCP) considera los siguientes riesgos: microbiológicos, físicos, químicos u otras anomalías detectables por inspección sensorial. El HACCP es un elemento a partir del cual se pueden establecer límites máximos para los peligros y para el diseño de aplicación de sistemas de inspección; vigilancia y supervisión de los riesgos, y para el diseño y aplicación de sistemas de higiene de alimentos que buscan garantía de la calidad (INPPAZ, 1998; FAO, 1994; OMS/FAO, 1999).

La conducción de un análisis de riesgos es el primer paso para la elaboración del HACCP, éste consiste en la identificación de peligros, determinando su origen con base en evidencias epidemiológicas y la valoración del riesgo, considerando la probabilidad de que se presente y la magnitud de sus resultados. Los componentes del análisis de riesgo son: evaluación, gestión y comunicación del riesgo.

La evaluación del riesgo, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, siglas de Food and Agriculture Organization), es un proceso científico que consiste en estimar la probabilidad y magnitud de los daños que resultan de la exposición a un peligro (FAO, 1994). Aunque la información epidemiológica y comercial puede dar indicios de la existencia de un peligro, en los países en desarrollo esta información no muestra la situación real del peligro. Sin embargo, es necesario aplicar sistemáticamente la metodología de la evaluación del riesgo utilizando aquella

información disponible e incluso la de otros países, de esta forma será posible tener un acercamiento a la verdadera situación de los riesgos que imperan en el país. La evaluación del riesgo para la salud consta de 4 fases analíticas: (FAO, 1994)

1. **Identificación del peligro.** El interés de este punto se centra en identificar cualitativamente la presencia del peligro que puede ser perjudicial para la salud humana.
2. **Caracterización del peligro,** es la valoración cualitativa y cuantitativa de la naturaleza de los efectos perjudiciales sobre la salud en función de la dosis y magnitud del peligro.
3. **Evaluación de la exposición,** es la valoración cualitativa y cuantitativa del grado de exposición al hombre que probablemente se producirá y el efecto sobre éste.
4. **Caracterización del riesgo,** es la integración de las fases anteriores para estimar de manera cuantitativa los efectos perjudiciales sobre la salud.

El siguiente paso en el análisis de riesgos es la gestión del riesgo. En éste se evalúan alternativas con el objetivo de reducir el impacto del riesgo, reducir la probabilidad de que se presente, y en el peor de los casos la forma de enfrentar dicho riesgo. También se evalúa el costo y beneficio de cada una de las opciones para dichos fines (FAO, 1994).

En la fase de comunicación del riesgo se lleva a cabo el intercambio de información entre las partes interesadas en el análisis de riesgos. Las autoridades sanitarias, investigadores, instancias implicadas e incluso los consumidores emitirán su punto de vista y explicarán las decisiones derivadas de la evaluación y gestión del riesgo (FAO, 1994).

### **1.2.1 Análisis de Riesgos en el comercio internacional**

El análisis de riesgos es una metodología referida en acuerdos como el Tratado de Libre Comercio y el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias; el creciente intercambio comercial requiere la aplicación de conceptos que establezcan medidas dirigidas a la prevención de enfermedades, contaminación biológica de los alimentos, pérdida de producción y todos los costos que éstos generan para su control y erradicación. México como miembro de la Organización Mundial de Comercio tiene que apegarse a los Acuerdos sobre medidas sanitarias y fitosanitarias, las cuales establecen que los países integrantes tienen la obligación de basarse en la evaluación de riesgos considerando la evidencia científica disponible sobre el riesgo a evaluar, los métodos de procesamiento de los alimentos, así como los métodos de inspección y de muestreo, para facilitar el comercio sin comprometer la calidad e inocuidad de los alimentos y la salud del hombre y los animales. El Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través de la Dirección de Salud Animal y la Dirección de Vigilancia Epidemiológica, crea la Unidad de Análisis de Riesgos cuyo fin es discernir el riesgo que implica la probabilidad de presentación de un peligro y sus consecuencias, para facilitar la toma de decisiones y atribución de responsabilidades (FAO/OMS, 2002).

En septiembre de 1994 se publicó en el diario oficial de la federación el acuerdo que enlista las enfermedades y plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos; debido a la apertura comercial en varios países, con lo cual se incrementa la movilización de animales, sus productos y subproductos. Este acuerdo establece las prioridades de reporte de las enfermedades según su importancia epidemiológica por grupos, la importancia está dada por los efectos en la producción pecuaria, comercio internacional y salud pública. Al

respecto en el grupo 2 (integrado por las enfermedades enzoóticas transmisibles que se encuentran en el territorio nacional y que por sus efectos significativos en la producción pecuaria, comercio internacional, salud pública y de importancia estratégica para las acciones de salud animal en el país, son de notificación inmediata obligatoria a las dependencias oficiales de sanidad animal del país), que considera a las aves, se menciona el reporte obligatorio de casos de salmonelosis aviar (*Salmonella enterica* serovar Gallinarum, *Salmonella enterica* serovar Pullorum y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis). En el grupo 3 (constituido por las enfermedades que se encuentran presentes en el territorio nacional consideradas como enzoóticas pero que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional son de notificación mensual obligatoria), se menciona el reporte de salmonelosis en aves causada por *Salmonella* spp (SAGAR, 1994).

### **1.3 Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control**

El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control, HACCP por su nombre en inglés (Hazard Analysis and Critical Control Points), es empleado en la industria de los alimentos para garantizar la inocuidad en todas las fases de manipulación como son: producción, procesamiento y preparación de los alimentos (FAO, 1994).

El HACCP se origina en 1959 como respuesta a los requerimientos de la NASA ante la necesidad de desarrollar alimentos seguros, libres de patógenos y toxinas biológicas. Sus principios, que han evolucionado desde 1960, en general buscan garantizar la calidad de los alimentos en base al control preventivo de los riesgos durante la producción, en lugar de hacer la inspección y validación del producto final. El HACCP está constituido por siete principios, que se basan en la identificación, evaluación y control de los riesgos sobre los

alimentos, los principios son los siguientes: 1) análisis de riesgos, 2) determinación de puntos críticos de control, 3) establecimiento de límites críticos, 4) establecimiento de procedimientos de monitoreo, 5) establecimiento de acciones correctivas, 6) establecimiento de procedimientos de verificación y 7) mantenimiento de un sistema de registro y documentación (FAO, 1994; Kenneth *et al.*, 1999).

La producción de alimentos inocuos bajo el sistema HACCP requiere para su implementación en la industria de programas prerrequisitos con la función de crear condiciones operativas óptimas. Los programas prerrequisitos son: las buenas prácticas de manufactura (BPM), los procedimientos de operaciones estandarizadas (POE) y los procedimientos de operaciones estandarizadas de saneamiento (POES) (Kenneth *et al.*, 1999).

#### **1.4 Criterios microbiológicos**

Los criterios microbiológicos ayudan a evidenciar un riesgo determinado, estableciendo de esta forma el grado de calidad y la inocuidad del alimento. Estos criterios permiten realizar un seguimiento de buenas prácticas de manufactura, distinguiendo la aceptabilidad del producto. Su aplicación es importante, ya que es inevitable que se pueda presentar cierto grado de contaminación microbiológica de los alimentos y la sola inspección organoléptica no permite garantizar la ausencia de patógenos como es el caso de *Salmonella* spp. Organismos como la Organización Mundial de Salud (WHO) recomiendan su aplicación (ICMSF, 1999); los programas de muestreo son una herramienta en el comercio internacional de alimentos para obtener especificaciones microbiológicas acerca de un lote (FAO, 1994).

Los principios generales para la selección de criterios microbiológicos son: evidenciar el riesgo para la salud, considerar la ecología microbiana de las

canales, así como el efecto del procesamiento sobre la microbiología del alimento, la probabilidad de contaminación y/o crecimiento de microorganismos y sus consecuencias sobre la manipulación posterior, almacenamiento y consumo; finalmente el costo/beneficio asociado con la aplicación del criterio (ICMSF, 1999).

#### **1.4.1 Programa de muestreo**

Los programas de muestreo de los alimentos se basan en el riesgo que representa al consumidor la presencia de microorganismos patógenos. La exigencia del programa aumenta con el tipo y grado de riesgo, por lo tanto su elección debe considerar: 1) el tipo de riesgo que representa el microorganismo en cuestión y 2) las condiciones previsibles de manejo y consumo a las que el lote de alimento se someterá tras el muestreo. El primer punto se refiere al grado de importancia del riesgo, si el riesgo para la salud es directo o indirecto y si su severidad es baja, moderada o grave. El segundo punto se refiere a las condiciones de modificación del riesgo tras el muestreo, es decir si éste se reducirá al someter al alimento a algún tratamiento, como la aplicación de calor, rayos alfa, beta, gama, u otros, hasta eliminar al microorganismo, si las condiciones de manipulación no modifican el riesgo o si por el contrario lo aumentan. Así, los diferentes tipos de riesgos y las condiciones de manejo del alimento dan lugar a varias categorías de programas de muestreo, los cuales se muestran en el cuadro 1 (ICMSF, 1999).

Para la búsqueda de microorganismos en los alimentos se debe tener en cuenta que algunas bacterias patógenas deberán discriminarse entre su presencia o ausencia debido a que representan diferentes grados de riesgo al hombre. Por otro lado la presencia de bacterias no patógenas en los alimentos puede ser tolerada en distintos grados. Los programas de atributo

de dos clases tienen como objetivo poner en manifiesto la presencia o ausencia de un determinado microorganismo en las unidades de muestra, con lo cual se decide su aceptación o rechazo; según la Comisión internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods) los patógenos alimentarios deben agruparse en las categorías de riesgos graves, riesgos moderados de diseminación potencialmente extensa y riesgos moderados de diseminación limitada, considerando el riesgo que representan al consumidor. *Salmonella enterica* serovar Typhi se agrupa en la categoría de riesgo grave y otros serotipos de *Salmonella* se ubican dentro de riesgo moderado de diseminación potencialmente extensa (ICMSF, 1999).

El programa de dos atributos depende de  $n$  y  $c$ ;  $n$  es el número de unidades de muestra y  $c$  el número máximo de unidades de muestras que pueden ser positivas (ICMSF, 1999).

## **1.5 Salmonelosis**

Las enfermedades transmitidas por alimentos pueden presentarse como infecciones o como intoxicaciones. La infección es consecuencia de la invasión del hospedero o de la liberación de toxinas de los microorganismos que han sido ingeridos con el alimento y que colonizan el tracto intestinal u otros órganos. Las intoxicaciones transmitidas por alimentos son consecuencia de la ingestión de toxinas liberadas en el alimento por los microorganismos que se han desarrollado en éste antes de la ingestión (Mossel, 2003).

La salmonelosis es una infección gastrointestinal causada por varios serotipos de *Salmonella*. Los síntomas de la infección aparecen después de la colonización de epitelio del intestino delgado y grueso por las bacterias; La mayoría de las cepas producen enterotoxinas. Todas las especies de

*Salmonella* son patógenas para los humanos, *Salmonella enterica* serovar Typhi es responsable de la fiebre tifoidea, *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A, B y C ocasionan la paratifoidea. Estas bacterias se transmiten generalmente por el agua contaminada y pocas veces por alimentos, en general son de origen humano y a veces se aíslan de otras especies animales. Por otro lado la salmonelosis es el cuadro clínico causado por algunos serotipos como son: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* serovar Tipymurium, *Salmonella enterica* serovar Agona, *Salmonella enterica* serovar Anatum, *Salmonella enterica* serovar Montevideo, *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, *Salmonella enterica* serovar Newport y otras especies. (Mossel, 2003)

Las bacterias del genero *Salmonella* son bacilos gram negativos, anaerobios o aerobios facultativos, éstos se clasifican por la detección de antígenos presentes en su estructura: el somático “O”, flagelar “H” y de superficie “Vi”. El antígeno Vi es el más superficial, cubre casi por completo al antígeno “O”, el antígeno flagelar y el de superficie son proteínas termolábiles por lo que son destruidas al calentarse las bacterias, lo que permite identificar el antígeno “O”. Los serotipos hasta ahora conocidos se han identificado mediante reacciones de aglutinación utilizando sueros preformados contra los tres antígenos (O, H y Vi). El antígeno O puede tener dos o tres determinantes antigénicos específicos, la clasificación de éstos se hace alfabéticamente designando grupos de la A a la Z y numéricamente dentro de cada grupo. Dentro de las especies importantes se encuentran *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, de ésta se tienen seis subespecies: *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* y *enterica*, esta última subespecie es de la cual derivan las más de 2 000 serovariedades hasta ahora identificadas. De *S. bongori* sólo se han identificado unas 20 serovariedades, mientras que de *S. enterica* subespecie *enterica* se han identificado 1443 serovariedades, de *S. enterica* subespecie *salamae* 488, de *S. enterica* subespecie *arizonae* 94, de *S. enterica* subespecie *diarizonae*

323, *S. enterica* subespecie *houtenae* 70 y de *S. enterica* subespecie *indica* 11 serovariedades (Wray *et al*, 2000).

### **1.5.1 Factores de virulencia y toxinas de *Salmonella* spp.**

La membrana externa de las bacterias Gram negativas funciona como protección contra la acción de las enzimas digestivas y la acción detergente de las sales biliares. Esta propiedad está dada por las interacciones hidrofóbicas e iónicas que se dan entre las porciones oligosacáridas de la membrana. Las bacterias Gram negativas presentan lipopolisacáridos (LPS) que forma parte de la membrana externa de las bacterias. Este componente estructural de las bacterias contribuye y participa en la patogénesis de la enfermedad. El LPS se denomina endotoxina pues durante la lisis bacteriana sus componentes son liberados (lípidos A). Consta de un polisacárido y un lípido, el polisacárido se diferencia en dos regiones, la región I determina la especificidad serológica del antígeno O, se trata de un oligosacárido O-específico compuesto por unidades de 1 a 7 monosacáridos que repiten su secuencia, esta región también da la característica en las colonias de tener bordes rugosos o lisos. La región II, núcleo del polisacárido o región central del LPS se divide en porción interna y porción externa, ambas son generalmente constantes en la mayoría de las bacterias entéricas, la porción interna está compuesta por cetodesoxioctonato (KDO) que se une al polisacárido O-específico y la porción externa contiene glucosa, galactosa y N-acetil glucosamina. El lípido A, también conocido como región III, determina los efectos tóxicos del LPS y está compuesto por ácidos grasos como el cáproico, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico. En general la membrana externa tiene dos funciones biológicas, una es la estructural y la otra como factor tóxico, ésta última característica está asociada particularmente al lípido A; si bien el lípido A es el responsable de la toxicidad del lipopolisacárido, el complejo completo es necesario para causar

efectos tóxicos, el papel del polisacárido es hacer que el lípido sea hidrosoluble e inmunogénico (Mossel, 2003; Pérez *et al*, 1990).

## **1.6 Métodos para la detección de microorganismos en alimentos**

Los medios de cultivo microbiológicos, como método convencional para el aislamiento de *Salmonella* spp. en los alimentos, incluyen preenriquecimiento, enriquecimiento y selección de colonias para su confirmación bioquímica y serológica. Otros métodos como los de análisis inmunológico, reacción en cadena de la polimerasa, ácidos nucleicos, hibridación, etc., han resultado muy convenientes, particularmente en el área de alimentos, pues proveen resultados rápidos y definitivos. Estos procedimientos han sido combinados unos con otros, tomando de cada uno de ellos los elementos que permitan aumentar la sensibilidad y especificidad.

### **1.6.1 Método de ELISA**

La prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), tiene como fundamento el uso de anticuerpos purificados dirigidos contra antígenos específicos como son: lipopolisacáridos, fimbrias y flagelos. El método TECRA<sup>®</sup> (Salmonella Visual Immunoassay) es una prueba representada en configuración de sándwich, los pozos tienen adsorbidos a su superficie anticuerpos para *Salmonella* spp, si la muestra contiene al antígeno flagelar de *Salmonella* spp. éste será capturado por el anticuerpo adherido y al adicionar el conjugado, que consiste en anticuerpos marcados con enzimas, se completará el sándwich. La presencia de *Salmonella* spp. se indicará al adicionar el sustrato con el cual el conjugado desarrolla un color verde a diferentes intensidades, estos resultados son interpretados de acuerdo a una carta de colores anexa al kit. Este es un método validado por la AOAC (Association of Analytical Communities) (TECRA, 2004).

### 1.6.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR es el método de amplificación de secuencias específicas de DNA en la cual se incrementa exponencialmente la cantidad de dicha secuencia. Es un procedimiento *in Vitro* rápido y sensible que consiste en ciclos repetitivos de desnaturalización del DNA seguidos de la alineación de los primers a las cadenas sencillas de DNA y extensión de las mismas por la adición de oligonucleotidos. El incremento en el número de copias de la secuencia de DNA del microorganismo en estudio incrementa la posibilidad de su detección frente a muchos más microorganismos presentes en una muestra (Murray, 1994).

La PCR multiplex permite la detección específica de diferentes especies de *Salmonella* utilizando tres pares de primers *phoP*, *Hin* y *H-li*. De forma simultánea se pueden detectar bacterias patógenas coliformes como *Shigella*, *Escherichia coli* y especies de *Citrobacter*. Los primers *phoP* permiten la identificación de estas bacterias, mientras que *Hin* y *H-li* permiten detectar genes que sólo están presentes en especies móviles de *Salmonella*. Recientemente se han desarrollado métodos de PCR para la identificación de *Salmonella* spp. móviles como: Gallinarum y Pullorum, buscando el gen *rfbS*. Lo anterior permite detectar algunas especies y diferenciar una de otra (Devendra *et al*, 2005).

## 2. JUSTIFICACIÓN

El pollo es un producto asociado frecuentemente a enfermedades transmitidas por alimentos, evidencias epidemiológicas nacionales e internacionales, así como comerciales indican la existencia de riesgos microbiológicos en todas las fases de su cadena productiva. Los escasos datos nacionales hace necesario llevar a cabo un análisis de riesgos que provea información acerca de los factores de riesgo asociados a la presencia de microorganismos en el pollo, específicamente *Salmonella spp.* La evaluación de riesgos es un elemento crítico del sistema de análisis de riesgos que tiene como objetivo garantizar la inocuidad de los alimentos y que adquiere cada vez mayor importancia dentro de la industria alimentaria y el comercio internacional. El interés por determinar la presencia de *Salmonella spp.* en el procesamiento del pollo, con los métodos de ELISA y PCR, se debe a la importancia que tiene el uso de métodos específicos que garanticen la inocuidad de los alimentos.

### **3. HIPÓTESIS**

El análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas y la reacción en cadena de la polimerasa son procedimientos que permitirán establecer que *Salmonella* spp. representa un peligro en el procesamiento de pollo de engorda.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Evaluar el riesgo de *Salmonella* spp. en el procesamiento de pollo de engorda en el rastro municipal de León, Guanajuato, México.

#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Recopilar información epidemiológica relacionada con las cuatro fases analíticas de la evaluación de riesgo de *Salmonella* spp.
2. Identificar los factores de riesgo para la contaminación, sobrevivencia y proliferación de *Salmonella* spp. durante el procesamiento del pollo de engorda.
3. Confirmar que *Salmonella* spp. es un peligro en las etapas del proceso consideradas puntos críticos de control y operaciones críticas.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se desarrollaron los cuatro puntos de la evaluación de riesgo: 1) Identificación del peligro, 2) Caracterización del peligro, 3) Evaluación de la exposición y 4) Caracterización del riesgo. Mediante un plan de trabajo que se dividió en dos fases:

- 1) Fase de campo que comprendió la identificación y caracterización del peligro, así como la caracterización de riesgo.
- 2) Fase de laboratorio que comprendió la evaluación de la exposición.

### 5.1 Fase de campo

Se realizó una estancia en el rastro municipal de León Guanajuato con el fin de evaluar las condiciones del procesamiento y elaborar el diagrama de flujo del proceso *in situ* (figura 1). Simultáneamente se llevó a cabo un estudio piloto (Anexo 1), tomando 15 muestras de canales posterior a las fases de desplumado y pintado, las cuales fueron analizadas de acuerdo a la NOM-114 para el aislamiento de *Salmonella* en alimentos. Los resultados indicaron la ausencia de *Salmonella* spp. en las canales de pollo. También se realizó la consulta de fuentes bibliográficas, hemerográficas y direcciones electrónicas de Internet de la Secretaria de Salud, Organización Mundial de la Salud y otras fuentes de información afines.

#### 5.1.1 Selección del programa de muestreo para *Salmonella* spp.

Los programas de muestreo recomendados para *Salmonella* spp. van desde la categoría 10 hasta la 15 (cuadros 1 y 2). Sin embargo, la severidad del programa debe incrementarse considerando el riesgo derivado de las

condiciones de utilización inmediatas al muestreo, en el caso de las canales de pollo, las condiciones de riesgo están influenciadas por los métodos de conservación, transporte antes de que lleguen a manos del consumidor y su cocción (ICMSF, 1999). Considerando que la cocción es necesaria para el consumo del pollo y que ésta condición reduce el riesgo, se pueden elegir las categorías 10 y 13 de muestreo, el tamaño de  $n$  en estas categorías es 5 y 15 respectivamente; sin embargo, se tomaron 16 canales en cada lote para la identificación del peligro.

### **5.1.2 Selección de puntos de muestreo**

La toma de muestras se realizó al azar, en aquellas fases donde se identificaron Puntos Críticos de Control (PCC) que son las fases en el proceso alimentario en que se aplican controles con el fin de prevenir, eliminar o reducir hasta niveles aceptables un riesgo, por otro lado las Operaciones Críticas (OC) son aquellas donde se puede promover la contaminación y no existe factores físicos, químicos o biológicos que la reduzcan o eliminen. Para la sección de PCC y OC se empleó el árbol de decisión (figura 2), recomendado por el Código Alimentarius para el análisis de riesgos durante la elaboración de un HACCP (OMS/FAO, 1999).

De acuerdo a dicho procedimiento se identificaron peligros significativos (Cuadro 3). El PCC fue: lavado de la canal y las OC: desplumado, pintado y eviscerado de la canal (Figura 3). Por lo anterior los puntos de muestreo se establecieron después de cada una de las fases de desplumado, pintado, eviscerado y lavado de la canal.

## **5.2 Fase de laboratorio**

Se tomaron 4 canales de cada una de las 4 fases señaladas (figura 3), la toma de muestras se realizó en 5 lotes diferentes (Cuadro 4) hasta conseguir un total de 80 canales muestreadas.

### **5.2.1 Toma y manejo de muestras**

Las canales se seleccionaron al azar y se tomaron de la línea de procesamiento con guantes estériles, se colocaron en bolsas de plástico identificadas con el número de muestra y etapa del procesamiento de la cual se extrajeron. Se colocaron en hieleras para su transporte al laboratorio, el cual fue de aproximadamente 5 horas desde el término del muestreo hasta su llegada al laboratorio.

### **5.2.2 Búsqueda del peligro**

La búsqueda del peligro se realizó en dos etapas:

- Primera: Prueba de ELISA.
- Segunda: Método de PCR.

La detección de *Salmonella* spp. en las muestras se realizó por el método de lavado de la canal, el cual consistió en colocar cada canal en una bolsa de plástico a la cual se le agregaron 300 ml de agua peptona tamponada (pH 7) estéril, se agitaron por 30 segundos cubriendo con el agua superficies internas y externas de la canal, una vez lavada la canal se retiró de la bolsa y el agua de lavado se vació en un recipiente estéril (ICMSF, 1999).

El agua de lavado constituyó la unidad de muestra para el desarrollo de la prueba *in vitro* Salmonella Visual Inmunoassay TECRA® y la Reacción en

cadena de la Polimerasa, para la detección de *Salmonella* spp. Para esto se llevó a cabo el siguiente protocolo de enriquecimiento:

Pre-enriquecimiento: se colocaron asépticamente 25 ml del agua de lavado (muestra analítica) en un recipiente estéril y se le adicionaron 225 ml de caldo Lactosado, la mezcla se homogeneizó y se incubó a 35-37°C por 18 a 22 horas.

Enriquecimiento: se agitó el cultivo de preenriquecimiento y se transfirieron 0.1 ml a 9.9 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis. Se incubó a 41-43°C por 16-20 horas.

Post-enriquecimiento: se transfirió 1 ml del caldo de enriquecimiento, a 10 ml caldo M (recomendado y distribuido por TECRA). Se incubó a 35-37°C por 6-8 horas.

#### **5.2.2.1 ELISA**

El TECRA<sup>®</sup> Salmonella Visual Inmunoassay, es una prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) representada en configuración de sándwich, validado por la AOAC (Association of Analytical Communities), (Hugues, 1996) y consiste en 7 diferentes protocolos de enriquecimiento dependiendo del tipo de alimento y del nivel de contaminación previsible. Se eligió el protocolo 2- RV[R10] – AOAC Approved Method (998.09) Option 2, para productos con una alta contaminación bacteriana como son los alimentos crudos. (TECRA, 2004)

Protocolo 2:

1: Tratamiento térmico de la muestra.

Se transfirió 1 ml de cada muestra de post-enriquecimiento (Caldo M) en un tubo de polipropileno identificado con el número de muestra. Los tubos se sometieron a calentamiento en autoclave (vapor, sin presión) por 15 minutos a 100°C. Se esperó a que la temperatura de los tubos descendiera a temperatura ambiente.

#### 2: Preparación de la muestra en los pozos.

Se preparó en la placa de soporte un pozo para cada muestra, un pozo para el control positivo y otro para el control negativo. Se marcó la posición de cada muestra en los pozos utilizando una tarjeta de registro del kit.

#### 3. Adición de la muestra.

Se transfirieron 200 µl de cada muestra de postenriquecimiento y de los controles positivo y negativo en los pozos correspondientes. La placa de soporte se cubrió con la película plástica y se incubó por 30 minutos a 35-37°C.

#### 4: Primer lavado.

Con una piseta se colocó agua de lavado dentro de los pozos, se invirtió rápidamente la placa de soporte para vaciar el agua en un recipiente. El agua residual se removió por medio de golpes firmes de la placa de soporte, sobre toallas de papel colocadas en la mesa. Este paso se repitió tres veces.

#### 5: Adición del conjugado.

Se adicionaron 200 µl de conjugado (anticuerpos marcados con enzimas) a cada pozo, se cubrió la placa de soporte con la película plástica y se incubó por 30 minutos a 35-37° C.

#### 6: Segundo lavado.

Se realizó el lavado cuatro veces, siguiendo los pasos del primer lavado.

#### 7. Adición del sustrato.

Se adicionaron 200 µl de sustrato a cada pozo, se incubó por 10 minutos a 20-25°C (temperatura ambiente).

#### 8: Lectura de resultados.

La lectura de resultados se realizó de acuerdo a la carta de colores (card 1) anexa al kit (figura 4), tomando el siguiente criterio: a los 10 minutos, el control positivo debió ser equivalente al panel 4 de la carta de color, sólo se continuó la incubación, si después de 10 minutos el control positivo no era equivalente al panel 4 de la carta de color. Se colocó la placa de soporte sobre un fondo blanco para comparar los pozos individualmente con la carta de color.

#### 9: Adición de la solución para detener la reacción.

Se adicionaron 20 µL de solución stop a cada pozo y se incubó durante 30 minutos, los resultados fueron leídos después de mezclar con movimientos suaves la placa.

#### 10: Interpretación de resultados.

Se utilizó la carta de color, la cual consiste en 5 variedades desde blanco a verde intenso, los colores 1 y 2 de la carta de color corresponden a las reacciones negativas y el 3, 4 y 5 corresponden a las reacciones positivas. Se compararon cada uno de los pozos con la carta de color para identificar reacciones negativas y positivas.

Se utilizó como control positivo una cepa de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis proveniente de un aislamiento clínico de aves, la cepa fue identificada por pruebas bioquímicas empleando el sistema Vitek (Jordá,

2005) y serotificada (anexo 2). La cepa recibió el mismo tratamiento (protocolo 2- RV[R10]) que el resto de las muestras y se probó en cada uno de los lotes.

### **5.2.2.2 PCR**

#### **5.2.2.2.1 Extracción de DNA**

Las muestras enriquecidas en caldo M fueron empleadas para la extracción de DNA. Los microorganismos se recuperaron por filtración de 1.5 ml de caldo M, usando membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  y porta filtros estériles para cada muestra. Las membranas con restos de microorganismos se cortaron en cuatro y se colocaron en tubos para centrífuga de 5 ml con 2100  $\mu\text{L}$  de bufferTES [Tris base 0.005M, EDTA 0.005M pH8, NaCl 0.05M], se agitaron en vortex 10 m y se centrifugaron a 3000 rpm 10 m, inmediatamente se distribuyeron volúmenes de 500  $\mu\text{L}$  del líquido en tubos ependoff de 1 500  $\mu\text{L}$ , usando 4 por muestra; fueron agregados 20  $\mu\text{L}$  de lisozima a cada tubo e incubados a 37°C por una hora. En seguida se agregaron 8  $\mu\text{L}$  de pronasa (20mg/ $\mu\text{L}$ ) y 8  $\mu\text{L}$  de RNAasa y se incubaron a 65 °C 1 h, después 120  $\mu\text{L}$  de SDS (10%) se agregaron a cada tubo y se incubaron a 65 °C 30 m. Posteriormente se adicionaron 600  $\mu\text{L}$  de una mezcla de fenol-cloroformo (25:24) a cada tubo agitándose hasta conseguir una emulsión, la cual se centrifugó 5 minutos a 10 000 rpm para obtener 3 fases, la fase superior, que contiene DNA, se recuperó en un tubo ependorff nuevo para adicionarle 2 volúmenes de etanol absoluto (-20°C), esta mezcla se agitó suavemente y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos. Una vez precipitado el DNA con etanol, el sobrenadante se decantó y el tubo se colocó a 60°C por 1 h para evaporar el etanol. Con este método se

obtuvo una pastilla de DNA en el fondo del tubo, la pastilla se resuspendió en 15  $\mu\text{L}$  de TE [10 mM Tris, EDTA 1mM pH8] a 55°C 1 h, una vez rehidratado el DNA de los cuatro tubos, se llevaron a un tubo nuevo para obtener 60  $\mu\text{L}$  de DNA por muestra.

#### **5.2.2.2 Cuantificación de DNA y evaluación de su pureza.**

Se cuantificó el DNA extraído de cada muestra con un espectrofotómetro (UV/VIS Spectrometer lambda Bio20) midiendo la concentración de DNA de doble cadena. Se midió la absorbancia del DNA a una longitud de onda de 260 nm y de 280 nm para evaluar su pureza, se obtuvo la relación  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$  la cual debía ser cercana a 1.8. Paralelo a la cuantificación y evaluación de la pureza del DNA, se visualizó el DNA por electroforesis, para ello se utilizó un gel de agarosa al 0.8% y amortiguador TAE. En cada pozo se colocaron 10  $\mu\text{L}$  DNA más 2  $\mu\text{L}$  de colorante y fueron corridos a 60 v, 80 min. Los geles se colocaron en una solución de bromuro de etidio (10 mg/ml) y fueron visualizados con luz ultravioleta.

#### **5.2.2.3 Amplificación de los primers *pho P*, *Hin* y *H-li***

La amplificación de los 3 genes se realizó utilizando tres juegos de primers (cuadro 5). *Hin* y *H-li*, específicos para especies de *Salmonella* y *pho P*, para algunas bacterias coliformes. La mezcla de reacción se realizó en 25  $\mu\text{L}$  por muestra de DNA, compuesta por lo siguientes reactivos: 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X, 1.25  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ , 0.5  $\mu\text{L}$  DNTP's, 16.125  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril, 2.5  $\mu\text{L}$  de DNA molde, 0.625  $\mu\text{L}$  de enzima Taq Polimerasa y 0.25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los primers. La amplificación se realizó en un termociclador bajo las siguientes

condiciones (Way *et al.*, 1993): Desnaturalización a 94°C por 2 min., 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1.5 min., alineación a 62 °C por 30 s y extensión a 72°C por 1.5 min. después de esta repetición se realizó un ciclo de extensión a 72 °C por 7 m, después de terminar los ciclos, la reacciones se mantuvieron en congelación. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa (2%) por electroforesis (100 v, 35 min.), teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta.

Se utilizó una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC No. 14028) como control positivo, para la cual no se empleó el protocolo de enriquecimiento. Se sembró en TSA para obtener un crecimiento masivo el cual se tomó y se mezcló con buffer TES para agitarse en vortex tras lo cual recibió el mismo tratamiento que el resto de las muestras para la extracción de DNA.

Una vez cuantificado el DNA y visualizado en gel de agarosa, las muestras y controles fueron analizados por PCR. Se utilizaron 2.5 µL de DNA de las muestras de canales para la PCR independientemente de la cantidad de DNA cuantificado en cada una de ellas, para los controles se utilizaron 50, 10 y 5 ng de DNA (Figuras 5 y 6).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Evaluación del riesgo

#### 6.1.1 Identificación del peligro

La carne es un sustrato disponible para gran diversidad de microorganismos por contener gran variedad de nutrientes. Durante el procesamiento de las aves no es posible eliminar todos los microorganismos presentes en los animales vivos ni los que se le han agregado, pero sí pueden reducirse significativamente. Los microorganismos presentes en las canales de aves pueden dividirse en aquéllos que alteran la carne y causan putrefacción y enmohecimiento, los que no se asocian con enfermedades en el hombre denominados no patógenos y los que son capaces de producir enfermedad, denominados microorganismos patógenos. Por otro lado las bacterias patógenas presentes en los alimentos, pueden provocar en el hombre enfermedad alimentaria cuando invaden tejidos del hospedero o bien intoxicación alimentaria cuando su mecanismo de patogenicidad es producción de toxinas que afectan al organismo. Algunos microorganismos presentes durante el procesamiento de las aves, en las canales e incluso en los sacos aéreos de las aves recién escaldadas son *Clostridium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomona*, *Salmonella*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (ICMSF, 2001).

##### 6.1.1.1 Agente etiológico

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo móvil gram negativo, anaerobio facultativo. Es agente etiológico de cuadros de diarrea, septicemia y aborto en algunas especies animales. El período de incubación es de 5 horas a 5 días, típicamente tiene una

duración entre 6 y 48 horas, períodos cortos de incubación se asocian con la ingesta de altas dosis de células viables en personas susceptibles. La enfermedad dura aproximadamente 2.5 días y suele ser autolimitada; al comenzar la enfermedad los pacientes excretan gran número de células de *Salmonella* spp., aunque el número decrece con el tiempo, en algunas personas la eliminación del microorganismo persiste hasta después de 3 meses (Adams y Moss, 1997). Los síntomas más comunes en el hombre se caracterizan por fiebre, náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea (FAO, 1994). En general aunque afecta a todos los grupos de edad, los individuos menores de 5 años y mayores de 60 son los más vulnerables. La mayor incidencia reportada es en grupos de 15 a 64 años, resultando el de 25 a 44 años el más afectado (SSA 2003-2006; ICMSF, 1996). Un estudio realizado en Morelos, México, se reportó el aislamiento de *Salmonella* spp. en 3.2 % de niños sanos de 0 a 6 meses y en Mérida Yucatán en 1990, había una frecuencia de 5.15 a 7.27 de aislamiento de esta bacteria en niños de 0 a 90 días de edad (Suárez *et al.*, 1991; Chávez *et al.*, 2001).

#### **6.1.1.2 Identificación cualitativa del peligro**

En las últimas dos décadas las infecciones causadas por *Salmonella* spp. en humanos, han adquirido importancia debido al impacto económico y social, tanto en países desarrollados como aquellos en proceso de desarrollo. La salmonelosis es una enfermedad mundial transmitida por alimentos entre los que se incluyen los productos avícolas. En México la Secretaría de Salud a través del boletín epidemiológico reporta casos de fiebre tifoidea, paratifoidea y otras salmonelosis (Cuadro 6), en el caso de fiebre tifoidea el número total de casos reportados es de 20 239 en 2003 con una tasa correspondiente a 19.4 por cada 100 000 habitantes, la cual se elevó a 29.86 para 2005, con un número total de casos de 31 790. El

número de casos de Paratifoidea y otras Salmonelosis reportados en 2003 fue de 103 815 con una tasa de 99.6; en 2006 los casos fueron 109 536 con una tasa de 102.90, para todas las observaciones el grupo de edad más afectado es el de 25 a 44 años (SSA, 2003- 2006).

Entre los factores que influyen de manera importante en los brotes de salmonelosis, se encuentra el consumo de alimentos de origen animal sometidos a deficiente cocción o con tratamientos de conservación inadecuados. Se ha establecido que la cocción inadecuada contribuye en un 67% en la presentación de brotes (Bean y Griffin, 1990). En México, un platillo elaborado con papa y queso fue empleado para valorar la sobrevivencia y proliferación de la *Salmonella* spp. Después de ser cocinado, se contaminaron tortas con 5 log UFC/g se frieron a una temperatura de 160 a 175°C por 4 a 6 minutos alcanzando el alimento una temperatura interna menor a 50 °C, las bacterias pudieron aislarse al final de la cocción (Medina *et al.*, 2005). Los alimentos comúnmente implicados son carne de res, cerdo, pollo y pavo, la presencia de *Salmonella* spp. se debe a la infección en el animal vivo o por contaminación de la canal durante su procesamiento. En la industria avícola del 10 a 15% de las canales de pavo se contaminan con esta bacteria antes del procesamiento y de 21 a 37% posterior al mismo (Bryan, 1983). Existen reportes en México de que el incremento de *Salmonella enterica serovariedad* Enteritidis en pollo es causa de 0.6% de casos de salmonelosis en humanos (Rodríguez *et al.*, 1990).

En Estados Unidos de América, el huevo se ha relacionado con el incremento de salmonelosis, sin embargo, en México el aislamiento de la bacteria a partir de este producto es menor al 0.02% (Rodríguez *et al.*, 1990). El huevo puede llegar a contaminarse vía transovárica cuando las gallinas de postura son portadoras de *Salmonella* spp., la superficie del

huevo puede contaminarse también durante la ovoposición ya que en la cloaca hay cantidades importantes de esta bacteria. Los nidos y superficies en donde es ovopositado y almacenado son importante fuente de contaminación (Humpherey, 1994). Se ha demostrado que gallinas expuestas a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis por inoculación o contagio, se pueden recuperar estos microorganismos de cloaca, ciego, ovario, oviductos, hígado y huevo. En Estados Unidos se estima que entre 4/1000 a 1/14 000 huevos están contaminados con *Salmonella* spp. por cualquier vía, sin embargo, la probabilidad de que una gallina infectada contamine un huevo es de 1 en 200 (Chávez, 2001). Otros alimentos implicados son leche fresca, agua y otros productos como chocolate, especias, sandía y cereal contaminados por fuentes animales (Bryan, 1983; Marth, 1969).

#### **6.1.1.3 Aplicación del Acta de 90 puntos para la identificación de riesgos en el rastro**

Por medio del Acta de 90 puntos de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) se calificó el grado de cumplimiento de la NOM-120-SSA1-1994 en el rastro municipal (Anexo 3). De las 90 preguntas que integran el acta, 76 son aplicables al rastro, considerando que 2 puntos corresponden a la calificación máxima que cada pregunta puede obtener, cuando el rastro cumple plenamente con lo establecido en la norma se obtendría un total de 152 puntos. Durante la fase de campo, al evaluarse las condiciones del procesamiento se elaboró el acta de 90 puntos, de acuerdo a la calificación asignada en cada pregunta se obtuvo un total de 65 puntos, lo cual indica que el rastro cumple en un 42.8% con lo establecido en la norma. Esta calificación no es satisfactoria, muchos factores durante el procesamiento hacen que el rastro municipal no cumpla con la norma. Estos factores son en su

mayoría los relacionados con el personal de las áreas de proceso y el control del proceso.

## 6.1.2 Caracterización del peligro

### 6.1.2.1 Caracterización cuantitativa del peligro

El diagnóstico de un brote de salmonelosis en humanos, se realiza por los signos y síntomas de los pacientes y en pocas ocasiones se realiza la identificación del microorganismo responsable. En un estudio publicado en México en 1964 se identificaron 74 serotipos de *Salmonella* en cepas aisladas entre los años 1940 y 1960. (Olarte y Varela, 1964) En 1985 se reportó la presencia de 80 serotipos diferentes en cepas aisladas entre 1974 y 1981 de las cuales 45.7% pertenecieron a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, 8.6% a *Salmonella enterica* serovar Derby y 7.8% a *Salmonella enterica* serovar Newport, todas éstas aisladas en muestras de humanos. En tanto los alimentos mostraron 27.9% de *Salmonella enterica* serovar Derby, 9.6% de *Salmonella enterica* serovar Anatum y 8.9% de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (González *et al.*, 1985)

En 1993 el Laboratorio Nacional de Salud Pública revisó el origen microbiano de las toxiinfecciones alimentarias que tuvieron lugar de 1980 a 1989 en el Distrito Federal y 16 estados de la República. *Staphylococcus aureus* fue el principal microorganismo implicado, provocando el 48.2% de los brotes. *Salmonella entérica* causó 34% de los brotes pues estuvo relacionada con 18 brotes, 596 casos y 4 defunciones, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fue el serotipo más frecuente (Parrilla *et al.*, 1993). En 2000 se revisaron los serotipos identificados entre 1972 y 1999, un

total de 199 serotipos fueron reportados durante este período, de éstos el más frecuente fue *Salmonella enterica* serovar Typhymurium seguido de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en humanos (Gutiérrez *et al.*, 2000). Al igual que en México en muchos países la frecuencia y la variedad de serotipos ha cambiado, en la mayoría de los estudios se ha observado un incremento en la frecuencia de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Salmonella enterica* serovar Tiphymurium, de éstos la primera ha mostrado, a partir de 1991 un aumento de menos del 10% hasta casi cuatro veces más en muestras humanas. Con respecto a la segunda se ha manifestado en una proporción entre 13 a 15 % del total de serotipos. *Salmonella enterica* serovar Tiphymurium fagotipo DT104 es en la actualidad la de mayor distribución común entre humanos, animales y alimentos, este fagotipo se caracteriza por ser multiresistente (Talavera, 2004).

En México los estados más afectados por esta bacteria son Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo. En el año 2003 se registraron 71 casos de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en Coahuila, 375 casos en Nuevo León y 1 caso en Puebla. En 2004 un estudio identificó el fagotipo en 73 aislamientos de cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis provenientes de la avicultura nacional, en 14 cepas se identificó el fagotipo 4, 29 aislamientos pertenecieron al fagotipo 8 y 30 aislamientos fueron no tipificables. En Jalisco se identificó el fagotipo 4, en Coahuila, Durango y Oaxaca el fagotipo 8 y en el estado de México, Morelos, Puebla y Querétaro los fagotipos 4 y 8 (Mancera, 2004).

#### **6.1.2.2 Dosis - respuesta**

Estudios en humanos indican que la ingestión de más de  $10^5$  células de *Salmonella* spp. es necesaria para desencadenar un cuadro clínico en

individuos sanos. El hombre posee barreras naturales para impedir la infección por *Salmonella* spp., sin embargo, en individuos inmunosuprimidos la infección puede establecerse rápidamente y causar graves daños. Durante la infección por este microorganismo se desarrolla respuesta inmune contra el LPS de la bacteria mediada por anticuerpos. No obstante son frecuentes las reinfecciones o recaídas después de 2 a 3 semanas (Jawetz *et al.*, 1992).

### **6.1.3 Evaluación de la exposición**

#### **6.1.3.1 Evaluación cualitativa**

Las aves alojan de manera natural gran variedad de microorganismos, la población microbiana de las canales de aves depende de la biota natural y transitoria de la piel y plumas, así como de la contaminación producida durante su procesamiento. Los mecanismos de contaminación y establecimiento de las bacterias en las canales se han estudiado ampliamente. El primer paso durante la contaminación de las canales es la retención de una película de agua en su superficie, el grado de contaminación final de la canal depende de la cantidad de microorganismos presentes en el agua. La inclusión de las bacterias en el producto se realiza cuando el agua de la superficie se absorbe a los folículos de la pluma. Tal situación las protege de ser eliminadas durante un posterior proceso de lavado e incluso de la descontaminación con agentes químicos. Las lesiones en la piel que pueden ocurrir durante las diferentes fases del procesamiento, contribuyen a la retención y mayor adsorción de microorganismos. El último paso en el establecimiento de bacterias en las canales es la adherencia del microorganismo al sustrato. Las *Salmonella* spp. tienen la capacidad para realizar este proceso en la fascia muscular de la canal. Al respecto se realizó un estudio en el que se

probaron 13 cepas de *Salmonella* spp., el resultado mostró que todas ellas se adherían en forma efectiva a las canales, al parecer el evento tiene lugar en la matriz de glicosaminoglicanos de la fascia o tejido conjuntivo de las fibras musculares inmediatas a la piel (ICMSF, 2001).

### **6.1.3.2 Evaluación de las condiciones sanitarias del rastro**

En el rastro municipal de León el procesamiento de las aves, (Figura 1) comienza con el colgado a la línea de procesamiento e insensibilización, estas fases al igual que el sacrificio y desangrado no parecen representar riesgo sobre la calidad microbiológica de las canales, aunque pocos estudios se han dirigido a evaluar estos aspectos. El colgado e insensibilización se realiza en el área de recepción de las aves, para luego pasar al área de proceso en la cual se desangran.

El escaldado de las aves (Figura 7) se realiza en un tanque de acero inoxidable, el cual es llenado con agua corriente que se calienta a 57-59°C y no se recambia hasta terminado el proceso. Esta fase es un factor muy importante, si bien el método de escaldado generalmente por inmersión en agua puede ser el adecuado para no permitir la proliferación bacteriana e incluso eliminar microorganismos, también puede contribuir a la contaminación posterior de las canales. La temperatura de escaldado suave (52°C por 3 minutos aproximadamente) no elimina la epidermis, temperaturas más altas pueden eliminarla con lo cual las bacterias encuentran un sustrato adecuado para su crecimiento. El agua de escaldado puede albergar microorganismos como *Salmonella* spp, *Staphylococcus* spp y otros, ya que durante el escaldado se libera tanto la materia fecal como las plumas, condicionando una contaminación cruzada de las canales. Bacterias del género *Salmonella* spp. se han detectado en canales después del escaldado, señalándose valores de reducción

decimal  $D_{52^{\circ}\text{C}}=150$  segundos y  $D_{62^{\circ}\text{C}}=8$  segundos para *Salmonella* spp. La materia orgánica acumulada en el agua de escaldado protege de cierta manera al microorganismo, la temperatura no es un obstáculo determinante para la destrucción de *Salmonella* spp. en esta etapa, sin embargo, la disminución del pH puede afectar la resistencia al calor de la bacteria. En estudios realizados al respecto con 7 diferentes cepas de *Salmonella* spp., se observó que valores de  $D_{52^{\circ}\text{C}}$  permitieron su supervivencia entre 10.2 a 34.5 minutos en escaldado cuando el pH se encontraba alrededor de 6. En otro estudio las células de *Salmonella* spp. sobreviven al escaldado a  $55^{\circ}\text{C}$  por 105 segundos y no son detectadas cuando son escaldadas a  $60^{\circ}\text{C}$  por 200 segundos (Jawetz, 1992).

El área de desplumado (Figura 8) consta de 3 máquinas desplumadoras, éstas son fabricadas de acero inoxidable y dedos de plástico, en adición las desplumadoras 2 y 3 cuentan con un sistema de inyección de agua que permite el arrastre de los restos de plumas. Antes de pasar a la tercer desplumadora, las aves son cambiadas de posición manualmente (colgado de la cabeza). Durante el desplumado la difusión de microorganismos en los dedos de goma se ve favorecida por la humedad y calor que las canales transmiten al equipo, *Salmonella* spp. se establece fácilmente bajo estas condiciones. Un estudio en que se analizó el empleo de cuatro desplumadoras en el procesamiento de pavos, mostró que 14 lotes infectados con *Salmonella* spp. de manera natural contaminaron el equipo, la primera desplumadora resultó contaminada durante el procesamiento de 12 de los lotes (85.7%), la segunda resultó contaminada tras procesar 11 lotes (78.6%), la tercera durante el procesamiento de 7 lotes (50%) y la cuarta durante el procesamiento de 12 lotes (85.7%). En el mismo estudio se observó que el equipo que se emplea después del desplumado, también se contaminaba (ICMSF, 2001).

El pintado de la canal (Figura 9) es una práctica poco usual en el procesamiento del pollo de engorda, en el rastro de León se emplean un colorante natural a base de xantofilas. Éste es aplicado a las canales haciéndolas pasar por un recipiente de acero inoxidable que contiene agua con concentraciones variables del colorante a temperaturas de hasta 80 °C. Esta etapa por si sola no implica un riesgo, sin embargo, la intervención de individuos ajenos al proceso hace que ésta sea considerada como una operación crítica.

El eviscerado (Figura 10) se realiza manualmente por personal capacitado sobre la línea de procesamiento, la cual es independiente del escaldado, desplumado y pintado. Ésta constituye una de las etapas de mayor riesgo en el procesamiento del producto, los microorganismos pueden ser transferidos a las canales tanto por los utensilios (cuchillo, chaira y guates de acero), como por los operadores, por lo tanto se requiere de prácticas adecuadas para evitar la contaminación cruzada. En el rastro de León el eviscerado y lavado de la canal se realiza sobre el mismo espacio físico, incluso simultáneamente por el mismo operador. Esta área consta de una canaleta de acero inoxidable con un espacio para la salida de vísceras, el cual es de diámetro reducido, promoviendo con esto la acumulación y obstrucción del efluente. Algunas malas prácticas llevadas a cabo durante el eviscerado y lavado provocan la contaminación cruzada de las canales; la acumulación de agua y vísceras al obstruirse el efluente, la caída accidental de las canales a la canaleta y las salpicaduras que se producen dan indicios de una alta contaminación.

El lavado (Figura 11) se realiza por aspersión, generalmente se efectúa un sólo lavado tras el eviscerado, sin embargo, es más eficaz realizar varios lavados durante esta fase con el fin de prevenir el incremento de *Salmonella* spp.

El enfriado de las canales es una de las operaciones más importantes en el procesamiento de las aves pues retarda el crecimiento bacteriano, éste puede ser por inmersión en tanques de agua con o sin hielo, por aspersión de agua fría o por circulación de aire frío. En el rastro de León esta práctica se realiza por inmersión en agua con hielo y sólo ocasionalmente cuando es requerido por los introductores. El enfriamiento por inmersión en agua puede ocasionar la diseminación de *Salmonella* spp., al respecto en un estudio realizado se encontró que casi 55% de las muestras de agua fueron negativas a dicha bacteria, aunque se detectaron 19% de canales contaminadas de las cuales alrededor del 8% de las muestras presentaron cuentas de hasta 100 o más *Salmonella* spp. por mililitro (Green, 1987).

El grado de contaminación suele ser relativamente bajo al final del procesamiento, un estudio evaluó la incidencia de *Salmonella* spp. en 5 plantas de procesamiento durante 12-13 semanas, el resultado indica que la incidencia de *Salmonella* spp. osciló de 9 a 77% en cada planta con valores medios de 10 células por canal (ICMSF, 2001).

### **6.1.3.3 Evaluación cuantitativa**

#### **6.1.3.3.1 Ensayo de ELISA (TECRA®)**

Los cinco lotes muestreados en cuatro diferentes etapas durante el procesamiento de las aves (Cuadro 4), fueron negativos a la presencia de *Salmonella* en el Kit Salmonella Visual Immunoassay TECRA®, los resultados de uno de los lotes sometidos a la prueba se observan en la figura 4.

#### **6.1.3.3.2 PCR multiplex**

De las 80 canales muestreadas se recuperó DNA de 64 (debido a la pérdida de material genético durante su extracción), 12 (18.8%) amplificaron con los primers *phoP*, *Hin* y *H-li* lo cual indica que son positivas a *Salmonella* spp., 31 (48.4%) mostraron sólo productos de amplificación de *phoP* indicando la presencia de patógenos coliformes y 21 (32.8%) muestras no mostraron ninguna amplificación (figura 12). De las muestras positivas a *Salmonella* spp., 7 (11%) correspondieron al lote 1 y fueron obtenidas de las fases de desplumado, pintado y eviscerado de la canal (cuadro 7). En el lote 4 se encontraron 4 (6.3%) muestras positivas correspondientes a la fase de desplumado, eviscerado y lavado de la canal. En el lote 5 se encontró 1 (1.5%) muestra positiva correspondiente a la fase de eviscerado. Independientemente del lote, 7 (11%) canales procedentes de la fase de eviscerado, 2 (3%) de desplumado, 2 (3%) de pintado y una (2%) de lavado de la canal fueron positivas a *Salmonella* spp. De las 31 (48.8%) muestras positivas a enterobacterias, 16 % correspondieron a desplumado, 16% a pintado, 6% a eviscerado y 11% a lavado (Figura 13). Las figuras 14, 15, 16, 17 y 18 muestran los productos de PCR de los 5 diferentes lotes.

#### **6.1.3.4 Modelo de evaluación cuantitativa del riesgo**

Oscar (2004) diseñó un modelo predictivo para la evaluación cuantitativa del riesgo de *Salmonella* spp. en pollo entero para consumo. “QRAM” por su nombre en inglés Quantitative Risk Assessment Model, considera los efectos de una contaminación inicial con *Salmonella* spp. en la canal de pollo, crecimiento bacteriano durante su almacenamiento, reducción del número de bacterias durante su cocción, cantidad de bacterias ingeridas por el consumidor, dosis responsable de una salmonelosis dependiendo

de la cepa involucrada y la probabilidad de respuesta a dichas dosis. El QRAM simula cinco etapas: el expendio de las canales de pollo, transporte, cocción, servicio del alimento y consumo, en cada etapa se consideran factores que pueden reducir o incrementar el riesgo, el grado de contaminación inicial es conocida utilizando el método del número más probable (MPN) y la contaminación final se estima por el programa @Risk. Los resultados de la predicción de 1 000000 interacciones con el QRAM indicaron que el riesgo de salmonelosis es de 17.8 casos por cada 1 000000 pollos consumidos y los casos de salmonelosis son 0.44 por cada 100 000 consumidores de pollo. Oscar (2004) cita a Bryan y Doyle (1995) quienes mencionan que estudios epidemiológicos indican de 15 a 20 casos de salmonelosis por cada 100 000 personas y que de 0.66 a 0.88 caso por cada 100000 son causados por consumo de pollo.

#### **6.1.4 Caracterización del riesgo**

Según el Codex Alimentarius, la caracterización del riesgo es la etapa de la evaluación del riesgo que permite determinar la probabilidad de que un riesgo se haga presente. En México como en muchos países la incompleta información epidemiológica, de brotes, número de casos en humanos y animales así como la prevalencia en granjas, impide caracterizar cuantitativamente el riesgo para el hombre y los animales. La gran diversidad de factores de riesgo determina que el peligro se haga presente o se evite, es por lo tanto prescindible discernir y considerar todos los riesgos para estimar sus consecuencias y la probabilidad de ocurrencia (Codex, 1981)

##### **6.1.4.1 Estimación cualitativa del riesgo**

El modelo bidimensional que evalúa el riesgo para la salud (cuadro 8) se emplea para valorar cualitativamente el riesgo de contaminación de las canales de aves con *Salmonella* spp. durante el procesamiento y el efecto

que tiene sobre la salud del consumidor. De acuerdo al ICMS (1999) este microorganismo representa un riesgo medio o moderado directo de diseminación posiblemente extensa, las líneas de intersección considerando a *Salmonella* spp. de severidad media y probabilidad de incidencia media, dan como resultado MM, lo cual indica cualitativamente un mediano riesgo de *Salmonella* spp. en las canales de pollo.

#### **6.1.4.2 Riesgos Relativos**

Los riesgos relativos de los que parte la probabilidad de presentación de un peligro y ocurrencia de determinados brotes de salmonelosis son los siguientes: (FAO/OMS, 2002)

En granjas:

- Prevalencia de *Salmonella* spp. en parvadas de pollo de engorda para consumo humano.
- Diversas vías de introducción de *Salmonella* spp. a las parvadas (alimento, vectores, animales de reposición, etc.).
- Fácil diseminación de los microorganismos a través del agua, cama y ambiente en general.
- Animales portadores asintomáticos.

En rastros:

- Difícil control de entrada de parvadas libres de *Salmonella* spp., excepto las serovariedades Gallinarum y Pullorum.
- Gran variación de región de origen de las parvadas.
- Deficiencia en la higiene durante el procesamiento (del equipo, utensilios y personal).

- Falta de vigilancia y monitoreo de las etapas críticas de control durante el proceso (temperatura y tiempo de escaldado, temperatura y tiempo de lavado de las canales, eviscerado, etc.).
- Falta de controles y acciones correctivas durante el procesamiento.
- Manejo de canales por personal portador de *Salmonella* spp.
- Mal manejo de la cadena fría durante e inmediatamente después del procesamiento.

Transporte, almacenamiento y consumo:

- Mal manejo de la cadena fría durante el transporte y almacenamiento
- Almacenamiento con otros alimentos contaminados
- Deficiencia en la temperatura y tiempo de cocción.
- Almacenamiento a temperaturas que permiten el crecimiento de microorganismos, después de la cocción.

En lo que respecta a las aves, sus productos y subproductos, el riesgo implica un impacto potencial en los consumidores sobre todo aquellos vulnerables por factores como estado inmunológico, edad y exposición al microorganismo. En este trabajo 18.8% de las canales fueron positivas a la presencia de *Salmonella* spp. lo cual indica la falta de medidas para eliminar el peligro de presencia de *Salmonella* spp. en la introducción de las aves al rastro y durante su procesamiento. La seguridad alimentaria no es absoluta y estos peligros siempre pueden darse, aunque las parvadas de aves sean libres de *Salmonella* spp. éstas corren el riesgo de contaminarse durante su procesamiento, transporte y preparación.

## 7 Discusión

En muchos países incluyendo México se ha observado un incremento de Salmonelosis en humanos, la frecuencia y la variedad de los serotipos ha cambiado, siendo los principales causantes de brotes *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Esto se ha asociado al consumo de huevo y carne de aves, sin embargo el aislamiento de estos serotipos en ambos alimentos en México es de 0.02% y 0.6% respectivamente (Rodríguez *et al.*, 1990), reduciéndose tal contaminación durante la cocción, última fase de la cadena alimentaria. Los aislamientos de *Salmonella* spp. en México a partir de muestras de humanos, animales y alimentos muestran que los serotipos más frecuentes son: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* serovar Derby, *Salmonella enterica* serovar Agona y *Salmonella enterica* serovar Anatum (Cabo, 2004). En México los estados con más casos de salmonelosis en humanos reportados son Chiapas, Tabasco, Veracruz y Jalisco (SSA, 1995-1998). Los lotes muestreados en este trabajo provenían de los estados de Jalisco y Guanajuato; Jalisco en 2003 fue el estado con mayor número de casos notificados y confirmados (666 y 168 respectivamente) de salmonelosis aviar, contrario a lo que se observó en Guanajuato que presentó un bajo número de reportes (16 casos), pero ninguno confirmado positivo (SIVE, 2003).

La tasa de morbilidad para fiebre tifoidea se elevó de 19.4 a 29.86 por cada 100 000 habitantes de 2003 a 2006 respectivamente. En el caso de Paratifoidea y otras salmonelosis la tasa se elevó de 99.6 a 102.90 por cada 100 000 habitantes en los mismos años. A partir de 1970 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ha emergido como la mayor causa de salmonelosis a nivel mundial principalmente en Europa, Norteamérica y Sudamérica, se estima que el 90% de casos reportados actualmente de enfermedades transmitidas por alimentos son causadas *Salmonella* spp. y *Campylobacter* (Cabo, 2004). En 1985, 76.1% de informes de la

OMS con respecto a los serotipos aislados en diferentes países correspondieron a *Salmonella enterica* serovar Enteritidis en 35 países, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en 8 países y *Salmonella enterica* serovar Typhi en 12 países (Uribe y Suárez, 2006).

Durante el procesamiento de las aves muchos factores intrínsecos pueden favorecer la propagación de la *Salmonella* spp., en este estudio se encontró que el escaldado, desplumado, pintado y lavado son operaciones que se convierten en importantes fuentes de contaminación por la liberación de microorganismos que pudieran provenir de la materia fecal, contenido intestinal, plumas y piel de las aves procesadas. La temperatura del agua de escaldado (57-59°C), del pintado (75-80°C) y tiempo de exposición (2.40 min. en escaldado y 10 s en el pintado) pueden permitir el inicio de un estado viable y no cultivable de *Salmonella* spp. debido al estrés fisiológico que le provocan las condiciones antes mencionadas. Durante el desplumado, la fricción de los dedos de goma de las desplumadoras sobre las plumas y piel de las canales favorece la dispersión de las bacterias que han sobrevivido, e incluso algunas de ellas encuentran el medio favorable para establecerse y multiplicarse en biofilms aun después de llevarse a cabo prácticas de higiene (ICMSF, 2001). El eviscerado es una operación crítica en el procesamiento de las aves, porque lleva implícito el riesgo de contaminación de las canales ya que su eficiencia depende de factores tales como ayuno y eviscerado manual o mecánico. El lavado de la canal es una práctica muy importante en el procesamiento de las aves, por ser la primera fase destinada a reducir la contaminación biológica después de la muerte del animal, su eficacia debe ser exhaustivamente vigilada, pues si bien un incremento de las cuentas bacterianas no es posible en esta etapa, si puede mantener la contaminación inicial de las canales.

La contaminación exógena producida en el rastro vía operadores, utensilios y equipo es posible en el rastro de León como se evaluó en el acta de 90 puntos. En

dicha evaluación algunos rubros tal como control del proceso, área de proceso, operaciones y equipo no cumplen satisfactoriamente con la norma, esto tiene especial importancia porque todas las operaciones se vuelven críticas al ser inadecuadamente aplicadas. Como se muestra en los resultados, en el desplumado y pintado se encontraron 3% canales positivas en cada etapa, esta contaminación aumenta en el eviscerado a 11%, lo cual indica que durante el desarrollo de dicha fase las practicas de higiene son deficientes por carecer de POES. Después del lavado esta contaminación se reduce en un 82% pues en esta etapa se encontraron 2% de canales positivas a *Salmonella* spp.

Las cuatro fases consideradas criticas por la presencia de *Salmonella* spp. después del diagnóstico situacional del rastro de León, fueron corroboradas con la PCR, la cual arrojó información suficiente para considerar las canales de pollo como riesgo, ya que de acuerdo a los programas de muestreo (programa de dos atributos), no es posible aceptar la presencia de *Salmonella* spp. en las canales de pollo para consumo humano ( $c=0$ ).

Los factores asociados a la presentación de dicho peligro, además de los ya mencionados, son aquellos que tienen que ver con las condiciones sanitarias a nivel de granja, lo cual tiene relación directa con la situación epidemiológica de la región en donde se ubican y sus medidas de bioseguridad. Es imposible obtener un producto libre de *Salmonella* spp. si existe contaminación primaria endógena en las aves y aunque la contaminación exógena puede controlarse a nivel de procesamiento es imposible obtener canales inocuas.

La utilidad de PCR y ELISA en la industria de productos de pollo y otros alimentos para la detección de patógenos ha sido ampliamente evaluada, pues se trata de métodos más rápidos y sensibles comparados con los métodos convencionales de cultivo, los cuales toman de 4 a 7 días para proporcionar un diagnóstico (Schrank *et al.*, 2001). Cuando se trata de riesgos durante la producción de los alimentos

resulta difícil esperar dicho tiempo para retirar el producto de la línea de producción.

Los métodos inmunológicos como el ELISA, para la detección y cuantificación de microorganismos en los alimentos están sumamente difundidos. Existe una amplia variedad de ensayos comerciales, sin embargo, debe elegirse el método adecuado para el análisis particular.

TECRA® es una prueba de ELISA que utiliza anticuerpos contra *Salmonella* spp. Los anticuerpos adheridos a la superficie de los pozos de la microplaca permite la captura del antígeno presente en las muestras. Debido a que esta prueba utiliza anticuerpos monoclonales contra el antígeno flagelar, representa significativos problemas de resultados falsos negativos, pues aunque los anticuerpos monoclonales son muy útiles para distinguir entre microorganismos muy parecidos antigénicamente (por poseen un alto grado de especificidad contra epitopes individuales), esto también representa una limitante, pues son incapaces de detectar todas la variedades de un mismo microorganismo debido a su alta especificidad y su baja afinidad (Tizard, 2001) . Ferro *et al.* (2002) compararon el kit TECRA UNIQUE con el método de cultivo en el análisis de *Salmonella* spp. en moluscos bivalvos, encontraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) pues existió una baja proporción de resultados positivos con TECRA en comparación con el cultivo. De forma contraria Cheung *et al.* (2006) no encontró diferencias estadísticas entre TECRA UNIQUE y el método convencional de cultivo, ellos inocularon alimentos crudos y alimentos rápidos con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enteritidis* serovar Enteritidis, *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Salmonella enterica* serovar Derby. Los autores lograron detectar las serovariedades Typhimurium, Enteritidis y Derby en los alimentos rápidos con ambos métodos cuando se inocularon con  $10^1$  UFC en 25 g de muestra. Sin embargo, obtuvieron resultados falsos negativos con ambos

métodos cuando las muestras analizadas fueron inoculadas con cantidades mayores de la serovariedad Typhi.

TECRA VIA (Visual Inmunoassay) y TECRA UNIQUE se diferencian en que la primera requiere un protocolo de enriquecimiento en caldo lactosado, caldo Rappaport Vassiliadis y caldo M, esto puede representar diferencias en la sensibilidad de ambos métodos. Al respecto Ramalho *et al.* (2002) utilizaron TECRA VIA, TECRA UNIQUE y el método convencional de cultivo para investigar la presencia de *Salmonella* spp. en alimentos crudos de origen animal, encontraron 75.6% de muestras positivas por el método de cultivo, 64.4 % positivas con el TECRA VIA y 60% positivas con TECRA UNIQUE, sus resultados indicaron que no existe diferencia estadística entre dichos métodos, aunque con TECRA UNIQUE se observaron 3 muestras positivas que no fueron detectadas con los otros métodos. Briggs *et al.* (2004) desarrollaron un protocolo que consiste en la adición de un aditivo (del mismo proveedor) al sistema TECRA, que evita el postenriquecimiento en caldo M. Utilizaron muestras de pollo y otros alimentos naturalmente contaminados con *Salmonella enterica* serovar Bovismorbificans y *Salmonella enterica*. en diferentes niveles (10-50 UFC/25 g y 1-5 UFC/25 g). No encontraron diferencia estadística en la proporción de muestras positivas con el nuevo protocolo en comparación con el método de referencia. Lo cual indica que es posible el análisis de las muestras a partir de caldo Rappaport Vassiliadis, evitando con esto de 6 a 8 h de incubación en caldo M.

El sistema TECRA utiliza anticuerpos contra más de 300 serotipos de *Salmonella* spp (Hughes *et al.*, 1996). La frecuencia de serotipos identificados en todo el mundo ha cambiado y aunque los de mayor importancia son *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, la distribución de los serotipos es variable, incluyendo el origen de éstos; Gutiérrez (2000), señala la distribución de los serotipos de *Salmonella* spp. según el origen de las muestras (humano, no humano), en muestras humanas las serovariedades más frecuentes

son Enteritidis y Typhimurium mientras que en muestras no humanas Derby y Anatum son las más comunes.

Hughes *et al.*, (2003) compararon dos protocolos de enriquecimiento con caldo tetracionato y caldo Rappaport Vassiliadis previo al empleo de TECRA en muestras de alimentos (huevo, pavo crudo, leche y chocolate), encontraron que no había diferencia significativa en la proporción de muestras positivas en TECRA con ambos protocolos de enriquecimiento, sin embargo, estos protocolos de enriquecimiento si llevaron a una diferencia significativa cuando se probaron con PCR. Guerrero *et al.* (1995) Utilizó muestras de carne de pollo provenientes de mercados públicos, para identificar *Salmonella* spp., empleando la técnica de cultivo y TECRA, encontró que el inmunoensayo permitía identificar mayor número de muestras positivas a *Salmonella* spp. que la técnica de cultivo, además al confirmar los resultados positivos de TECRA en medio de cultivo a partir de caldo M encontró 100% de concordancia. El número de células de *Salmonella* spp. en el alimento es importante, la técnica ELISA es capaz de detectar concentraciones de  $1 \times 10^5$  cel/ml al probar 200  $\mu$ L de caldo M, mientras que la técnica de cultivo requiere  $1 \times 10^7$  cel/ml a partir de caldo de enriquecimiento, esto aumenta la sensibilidad del ensayo. En tanto el manual de instrucciones TECRA menciona que es posible detectar 1 UFC de *Salmonella* spp. presente en 25 g de muestra.

La viabilidad bacteriana en alimentos contaminados de manera natural y artificial es diferente, debido a que durante el procesamiento los alimentos son expuestos a diversos factores que provocan estrés a las bacterias. Éstas responden al ambiente desfavorable inhibiendo su crecimiento, aumentando con esto el tiempo de incubación durante su enriquecimiento e incluso algunas mueren durante el procesamiento (Myint *et al.*, 2006). Aunque el protocolo de enriquecimiento utilizado en este trabajo fue el recomendado por el manual TECRA, las condiciones ambientales durante el procesamiento de las aves pudieron afectar fisiológicamente a las bacterias haciendo que la prueba ELISA presentara falsos

negativos debido a la baja cantidad de células cultivables. Además al utilizarse una cepa de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, ésta resulto positiva en TECRA a pesar de que recibió el mismo protocolo de enriquecimiento que el resto de las muestras, los controles positivo y negativo incluidos en el kit funcionaron de manera adecuada, lo cual sugiere que en las muestras de canales de pollo había células de *Salmonella* spp viables pero no cultivables.

En el presente estudio utilizando TECRA VIA, se obtuvieron resultados negativos a *Salmonella* spp. en las 80 muestras extraídas de las fases de desplumado, pintado, eviscerado y lavado de las canales de pollo, no obstante, estos resultados fueron diferentes a los obtenidos con PCR, con este método se encontraron 12 muestras positivas, lo cual indica que con TECRA se tuvieron 12 resultados falsos negativos. En un estudio similar, Partis y Newton (1998) utilizaron el método de TECRA y PCR, con el fin de evaluar su rapidez y rentabilidad, en el análisis de carne y otros alimentos. Ellos emplearon un protocolo de enriquecimiento con caldo Rappaport Vassiliadis y caldo selenito cistina y un segundo protocolo que consistió en postenriquecimiento en caldo M, de la misma forma en que se llevó a cabo en el presente trabajo. Los autores encontraron que las muestras de carne contaminadas con 27 UFC de *Salmonella* spp. fueron detectadas con ambos métodos TECRA y PCR, pero no lograron aislarse en medios de cultivo convencionales. Cuando las muestras se postenriquecieron en caldo M, la cuenta bacteriana se elevó a 27 000 UFC, en este caso los resultados de PCR fueron negativos a *Salmonella* spp. los autores sugieren que la elevada cantidad de bacterias presentes en la muestra inhibieron la PCR, no obstante que no fue posible su aislamiento en cultivo. En nuestro estudio, aunque se desconoce la cantidad inicial de *Salmonella* spp. en las muestras, al postenriquecerse con caldo M los resultados en TECRA indicaron ausencia de *Salmonella* spp. pero con PCR si fue posible la identificación de muestras positivas. De forma contraria, Partis y Newton encontraron que TECRA y PCR son consistentes entre si, pero no cuando

se comparan con el método convencional de cultivo. Pese a esto, consideraron que el método más rentable y sensitivo es PCR.

La capacidad de la PCR para detectar secuencias genéticas en poco tiempo es muy ventajosa ante otras técnicas como el cultivo que requiere una posterior serotipificación (Schrank *et al.*, 2001). Chen *et al.* (1997) evaluaron la eficiencia de la PCR en la amplificación de DNA de *Salmonella* spp. en muestras de pollo en las que no fue posible su aislamiento por el método de cultivo, las muestras positivas a *Salmonella* spp. fueron efectivamente confirmadas con la PCR. La razón por la que las células bacterianas no son aisladas en cultivos microbiológicos, es por que se encuentran en una fase no cultivable, en la PCR el material genético de la bacteria es suficiente para detectarla sin importar en que estado fisiológico se encuentre. Schrank *et al.* (2001) también compararon la PCR con el estándar de cultivo en la identificación de *Salmonella* spp. en productos de pollo, estos autores detectaron 63% de muestras positivas con PCR y solo 29% con el método de cultivo, esto corresponde a 47% más sensibilidad con la PCR frente al cultivo.

La PCR multiplex permite identificar especies de *Salmonella* y algunas enterobacterias, el iniciador *phoP* amplifica con todas las especies de *Salmonella* pues reconoce una secuencia correspondiente al antígeno somático que comparten algunas enterobacterias como *Escherichia coli*, *Shigella* y *Citrobacter* y que tiene que ver con su virulencia y capacidad de supervivencia frente a los macrófagos (Way *et al.*, 1993). Hin y H-li amplifican fragmentos que corresponden al antígeno flagelar por lo que permite identificar especies móviles de *Salmonella*; *Salmonella enterica* serovar Gallinarum y *Salmonella enterica* serovar Pullorum no amplifican con estos primers por carecer del antígeno flagelar. Las muestras positivas a *Salmonella* spp. (18.8%) pueden corresponder a las especies que se muestran en el cuadro 9. Aunque el método de PCR multiplex no puede discriminar entre serotipos de *Salmonella* spp, su ausencia total es necesaria para considerar inocuo un alimento. Las canales de aves muestreadas en el rastro de

León, de acuerdo a la Comisión internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos ICMSF (The Internacional Comisión on Microbiological Specifications for Foods) se podrán considerar de riesgo grave. *Salmonella enterica* serovar Typhi se agrupa en la categoría de riesgo grave y distintos serotipos de *Salmonella* spp. se ubican dentro de riesgo moderado de diseminación potencialmente extensa. (ICMSF, 1999)

Otros microorganismos que podrían estar contaminando las canales que amplificaron con el primer *phoP*, incluyen a *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Shigella boydii* tipo 1, *Shigella flexneri* tipo 2b y *Shigella sonnei*. Estos patógenos bacterianos son importantes causantes de diarrea aguda en humanos, y están muchas veces relacionados con gastroenteritis de origen alimentario. *E. coli*, es un patógeno que afecta de manera importante al hombre, existen cinco grupos de esta bacteria (EPEC, EIEC, ETEC, EHEC y FEEC), de los cuales la enterohemorrágica (EHEC) ha surgido actualmente como un significativo problema de salud, el serotipo O157:H7 es el agente etiológico de colitis hemorrágica en humanos. Callaway *et al.* (2004) citando a Hancock (1998) menciona que *E. coli* O157:H7 se ha aislado en muchos países a partir de productos alimenticios derivados de bovinos y cerdos, la prevalencia en bovinos es de 1 a 3%. En Estados Unidos 28% de los bovinos son positivos a esta serovariedad (Elder, 2000) mientras que este estudio menciona que se encontraron 2% de muestras fecales positivas, 1.25% muestras de bovinos positivas y 2% de muestras positivas en cerdos.

El genero *Shigella* es un patógeno natural y exclusivo del hombre y otros primates, su mecanismo de transmisión es feco-oral, generalmente por contacto directo aunque los alimentos y agua pueden servir como vectores. En este trabajo, el uso del iniciador *phoP* permite la identificación de *S. flexneri*, *S. boydii*, y *S. sonnei*. No es posible afirmar que este microorganismo estuviera contaminando las canales aunque tampoco es posible descartar su presencia (Coria *et al*, 2001).

Otro genero que posiblemente contamine las canales es *Citrobacter*, del cual la especie clínicamente más importante es *C. freundii* pues es causa de infecciones urinarias y excepcionalmente abscesos cerebrales, endocarditis y meningitis en recién nacidos. El iniciador *phoP* amplifica además de ésta especie a *C. diversus*.

Las bacterias antes descritas: *E. coli*, *Citrobacter*, *Shigella* y *Salmonella* spp. son indicadores de la deficiente higiene durante el procesamiento de los alimentos (Coria *et al*, 2001).

En este estudio 48.4 % de muestras amplificaron con *phoP*, como ya se menciona no se puede determinar a qué especies bacterianas corresponden. Podría tratarse de *Salmonella enterica* serovar Gallinarum o *Salmonella enterica* serovar Pullorum, sin embargo, las aves que entran a rastro requieren para su procesamiento ser libres de éstas serovaredades mediante un certificado zosanitario, por lo que puede suponerse que dichas canales son negativas a *Salmonella* spp. Las especies no móviles de *Salmonella* spp. no poseen el antígeno H (flagelar) por lo que en gel de agarosa no se observaran bandas de amplificación con *Hin* y *H-li* Para diferenciar entre estas especies de otras enterobacterias, se han empleado otros primers como *lamB* (Josephson, 1991).

*Salmonella* spp., específicamente del serogrupo D, poseen el gen *rfbs*, en el cual la serovar Gallinarum presenta residuos de adenina y guanina en la posición 559 de la secuencia de aminoácidos, mientras que la serovar Pullorum presenta los residuos en la posición 237. En base a este polimorfismo es posible distinguir entre las dos especies no móviles de *Salmonella* spp. (Park, 2001; Devendra, 2005). El antígeno H posee dos fases flagelares H1 y H2, *vh2* o *hin* es una invertasa que controla la variación de dichas fases. El primer *hin* amplifica una secuencia de 236 pb del DNA de *Salmonella* en fase 2 mientras *H-li* amplifica una región de 173 pb de DNA de *Salmonella* en fase 1; una *Salmonella* que posee ambas fases como es el caso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium,

presentará amplificación con ambos primers. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis que pertenece al serogrupo D no posee fase 2 por lo tanto no amplifica con *hin*, la razón según Way et al. (1993) es que este antígeno se pudo perder en alguna etapa de su evolución. Otras alternativas para la detección de *Salmonella* spp., son algunos fragmentos del gen *invA* (Chen, 1997; Alcázar, 2006).

Otros estudios han empleado sistemas de PCR multiplex para la detección de patógenos comúnmente asociados a los alimentos, como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* y *Shigella*. Li et al. (2005) utilizaron una secuencia de 252 pb del gen *uidA* de *E. coli*, una secuencia de 429 pb de un gen específico (ST) de *Salmonella* spp. y otra de 600 pb del gen *ipaH* de *Shigella*, en éste estudio fue posible detectar alimentos simultáneamente positivos a dichos patógenos en niveles de contaminación tan bajos como 0.2 log<sub>10</sub>/g. En un estudio similar Myint et al. (2006) evaluaron la sensibilidad y especificidad de los primers ST (ST11 y ST15) en la detección de *Salmonella* spp. en carne de pollo naturalmente contaminada empleando dos protocolos de enriquecimiento selectivo (caldo tetracionato y caldo Rappaport Vassiliadis), encontraron una diferencia significativa entre ambos protocolos. El caldo tetracionato parece ser más selectivo que el caldo Rappaport Vassiliadis en la amplificación de los primers ST11 y ST15.

Whyte et al. (2002) compararon la sensibilidad de la PCR contra el método de cultivo para detectar *Salmonella* spp. en pollo crudo utilizando el primer *Hin* dIII (DNA invertasa de H), sus resultados indicaron que la PCR fue considerablemente más sensible que el método de cultivo, (53% contra 30% respectivamente). Las técnicas de cultivo pueden resultar limitadas en la detección de *Salmonella* spp. debido a la presencia de factores inhibitorios de crecimiento presentes en los medios selectivos o bien que las bacterias se encuentran en un estado no cultivable debido a estrés.

## CONCLUSIONES

La evaluación de riesgos es un instrumento útil para identificar peligros en el procesamiento de los alimentos. El análisis de riesgos, al igual que los programas prerrequisitos (BPM, POE y POES), puede insertarse en los establecimientos que elaboran alimentos, previo a la aplicación del HACCP y como método de inspección en acuerdos internacionales de intercambio comercial de alimentos.

La información epidemiológica sobre *Salmonella* spp. da evidencia de la presencia de este riesgo en el procesamiento del pollo de engorda. Los puntos críticos y operaciones críticas reconocidas durante la fase de campo en el rastro fueron: desplumado, pintado, eviscerado y lavado de la canal, la presencia del peligro en estas etapas fue confirmada. Se identificaron 18.8% canales positivas a *Salmonella* spp. con el sistema PCR multiplex de las cuales 3% correspondieron a desplumado, 3% a pintado, 11% a eviscerado y 2% a lavado. El eviscerado, considerado PCC fue la etapa que mayor porcentaje de contaminación confirió a las canales.

Se encontraron 48.4% de canales positivas a enterobacterias (*E. coli*, *Shigella* y *Citrobacter*), de las cuales 16% correspondieron a desplumado, 16% a pintado, 6% a eviscerado y 11% a lavado. Esta contaminación también representan un peligro en el procesamiento de las aves, por lo anterior se puede sugerir que las canales de pollo procesadas bajo el sistema empleado en el rastro municipal de León, Guanajuato representan un riesgo mediano.

El método ELISA mostró resultados negativos a *Salmonella* spp. en las etapas estudiadas.

Las condiciones sanitarias de las prácticas llevadas a cabo en el procesamiento de las aves son deficientes, pueden permitir la supervivencia de microorganismos

patógenos y promover la contaminación de las canales. Sin embargo, no se puede establecer el origen de la contaminación (endógena o exógena), se requiere entonces de la aplicación de análisis de riesgos a nivel de granjas.

La alta sensibilidad de la PCR es de gran utilidad en la industria avícola específicamente en el área de procesamiento, pues permite el monitoreo de *Salmonella* spp. dentro de programas que evalúan riesgos en las diferentes fases del procesamiento de las aves.

## 9. Referencias

1. Adams M, Moss M. Microbiología de los Alimentos. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA, S. A, 1997
2. Bean H, Griffin M. Foodborne diseases outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogens vehicles, and trends. *Journal Food Prot.* 1990;53:804-817
3. Alcázar M, Rubio L, Núñez E, Alonso M. Detección de *Salmonella* spp. Y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en la vía pública en la Ciudad de México. *Veterinaria México.* 2006;37:417-429.
4. Briggs J, Dailianis A, Hughes D, Garthwaite I. Validation study to demonstrate the equivalence of a minor modification (TECRA ULTIMA protocol) to AOAC Method 998.09 (TECRA Salmonella Visual Immunoassay) with the cultural reference method. *J AOAC Int.* 2004 Mar-Apr;87(2):374-9.
5. Bryan L. Epidemiology of milk-borne diseases. *Journal of Food protection.* 1983;46:637-649.
6. Cabo V, Tenreiro R, Botelho M. Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: HACCP and inactivation studies. *Radiation Physics and Chemistry.* 2004;71:29-33.
7. Callaway T, Anderson R, Tellez G, Rosario C, Nava G, Eslava C, Blanco M, Quiroz M, Olguin A, Herradero M, Edrington T, Genovese K, Harvey R, Nisbet D. Prevalence of *Escherichia coli* O157 in cattle and swine in central Mexico. *Journal Food Protection.* 2004;67:2274-2276.
8. Chávez P, Higuera I, Huertas J, Báez M, Morales L, Arteaga C, Rangel F, Ponce de León R. Brote de *Salmonella enteritidis* en trabajadores de un hospital. *Salud Pública de México.* 2001;43:211-216.
9. Chen S, Yee A, Griffiths M, Larkin C, Yamashiro C, Behari R, Pazo-Kolva C, Rahn K, Grandis S. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain

reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. International Journal of Food Microbiology. 1997;35:239-250.

10. Codex (Codex Alimentarius Commission), 1981<sup>a</sup>. Codex Alimentarius Commission, Fourteenth Session, 1981: Report of 17th Session of the Codex Committee on Food Hygiene, Washington, D.C. 17.21 November 1980. ALINORM 81/13, Appendix II. General Principles for the Establishment and Application of Microbiological Criteria for Foods. Codex Alimentarius Comisión, FAO, Rome.
11. Coria L, Villalpando C, Demóstenes B, Treviño M. Aspectos microbiológicos y epidemiológicos para el uso racional de antibióticos en niños con gastroenteritis bacteriana aguda. Revista Mexicana de Pediatría. 2001;68:200-215
12. Devendra H, Park S, Cho M, Kim M, Chae J. Allele-specific PCR method based on rfbS sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum* from *Salmonella pullorum*: serotype-specific rfbS sequence polymorphism. Journal of Microbiological Methods. 2005;60:169-177.
13. Elder R, Keen G, Siracusa G, Barkocy-Gallagher G, Koohmaraie M, Lagreid W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. Proc. Natl. Acad. Sci. 2000;97:2999-3003
14. FAO. Utilización de los principios del análisis de riesgos y de los puntos críticos de control en el control de alimentos. Informe de una reunión técnica de expertos de la FAO, Vancouver Canadá 12-16 diciembre, 1994.
15. FAO/OMS. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Organización Mundial de la Salud. Foro Mundial FAO/OMS de Autoridades sobre Inocuidad de los Alimentos. Marrakech, Marruecos: FAO/OMS, 2002.
16. Ferro S, Ramón F, Conchas. Comparison About TECRA UNIQUE *Salmonella* and a Classical Method to Detected *Salmonella* from Bivalve

Mollusc. Santiago de Compostela. 4<sup>th</sup> International conference on Molluscan shellfish safety. June 4<sup>th</sup> – 8<sup>th</sup>, 2002.

17. González B, Becerril P, Bessudo D. Serotipos de Salmonelas identificados en México entre 1974 y 1981. Bol Oficina Sanit Paman 1985;99:34-39.
18. Green S. Result of a nacional survey: salmonella in broilers and overflow chill tank water, 1982-1984. Science Division, Food safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, Washington, DC. 1987.
19. Guerrero R. Investigación de *Salmonella* en carne de pollo crudo utilizando la técnica de inmunoensayo enzimático visual y la técnica de cultivo. (tesis) México (DF). IPN, ENCB. 1995.
20. Gutiérrez C, Montiel V, Aguilera P, González A. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. Salud Pública de México 2000;42 (6);490-495.
21. Hughes D, Dailianis A, Ash M. Comparison of Modified TECRA Visual Inmunoassay with AOAC Method 989.14 and Reference Culture Methods 967.25-967.28 for Detection of *Salmonella* in Foods and Related samples. J Assoc. Anal. Chem. 1996;79:1344-1359.
22. Hughes D, Dailianis A, Hill L, Curiale M, Gangar V. *Salmonella* in Foods: New Enrichment Procedure for TECRA Salmonella Visual Immunoassay Using a Single RV(R10) Only, TT Only, or Dual RV(R10) and TT Selective Enrichment Broths (AOAC Official Method 998.09). 2003;86:775-790
23. Humpherey T. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. International Journal of Food Microbiology. 1994;21:31-40
24. ICMSF. Microorganisms in Foods 5. España, Acribia, 1996.
25. ICMSF. Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas, 2<sup>a</sup> ed. Zaragoza, España, Acribia, 1999.
26. ICMSF. Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities. España, Acribia, 2001.

27. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. Programa de Salud Pública Veterinaria. Buenos aires: organización Mundial de la Salud, 1998:6-5.
28. Jawetz E, Melnick L, Aderberg AE. Microbiología Médica México D.F El Manual Moderno S.A de C. V 1992.
29. Jordá V, Vila A, Lanza A, Bonvehi P, Nazar J, Mikietuk A, Labat R, Smayevsky J. Utilidad del sistema *VITEK* en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. Acta Bioquím. Clín. Latinoam. 2005:39
30. Josephson K, Pillai S, Way J, Gerba C, Pepper I. Fecal Coliforms in soil detected by Polimesare Chain Reaction and DNA-DNA hybridizations. Soil Sci. Am. J. 1991;55:1326-1332.
31. Kenneth ES, et al. HACCP a systematic approach to food safety. The food Processors Institute Washington, D.C, 1999.
32. Li Y, Mustapha A. A simple PCR for simultaneous and rapid detection of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Citrobacter* in ground beef. Department of Food Science, University of Missouri-Columbia, 256 WCS Wing, Eckles Hall, Columbia, MO 65211. 2001.
33. Li Y, Zhuang S, Mustapha A. Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Esclerichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in raw and ready-to-eat meat products. Meat Science. 2005;71:402-406.
34. Mancera MA, Vázquez NJ, Heneidi ZA. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. Tec. Pecu. Méx. 2004;42(2):287-289.
35. Mansfield L, Forsythe S. The detection of *Salmonella* serovars from animal feed and raw chicken using a combined immunomagnetic separation and ELISA method. Food Microbiology. 2001;18:361-366.
36. Marth EH. *Salmonella* and Salmonellosis associated whit milk and products. A review, Journal of dairy Science 1969;52:283-315.

37. Medina A, Álvarez M, Fernández E. Sobrevivencia de *Salmonella* durante el freído de tortas de papa y ulterior comportamiento en el producto contaminado postcocción. Congreso Internacional de Inocuidad Alimentaria. 2005. Universidad Autónoma de Querétaro.
38. Mossel A, Moreno G, Struijk B. Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. Segunda ed. Editorial Zaragoza. España 2003.
39. Murray R, Wood A, Krieg R. Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington DC. American Society for Microbiology, 1994.
40. Myint M, Johanson Y, Tablante N, Heckert R. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. Food Microbiology. 2006;23:599-604.
41. Norma Oficial Mexicana NOM.114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.
42. Norma Oficial Mexicana NOM.120-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Practicas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas.
43. Olarte J, Varela G: epidemiología de la salmonelosis en México. En Van Oye E, ed. The World problem if salmonellosis. La Haya: W Junk publishers 1964; 554-563.
44. Organización Mundial de la Salud. Control de Salmonelosis: importancia en la higiene veterinaria y de los productos de origen animal. Informe de un comité de expertos de la OMS. Ginebra: OMS, 1998.
45. OMS/FAO. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Microbiological Risk assessment Series 1. World Health. 2002.
46. Oscar T. A quantitative risk assessment model for *Salmonella* and whole chickens. International Journal of Food Microbiology. 2004;93: 231-247.

47. Park M, Choi, K Kim M, Chae J. Differential diagnosis of *Salmonella gallinarum* and *pullorum* using PCR-RFLP. J. Vet Sci. 2001;2:213219
48. Parrilla C, Vázquez C, Saldate C, Nava F. Brotes de Toxicoinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública de México. 1993;35: 456-463.
49. Partis L, Newton K. Rapid screening for Salmonella in food using the Tecra Immunoassay kit and DNA amplification by the polymerase chain reaction. Research and Development Report Series. 1998;98-6.
50. Perez M, Suarez G, Flores C. Bacteriología General. Principios Químico Biológicos. Universidad Nacional Autónoma de México, 1990.
51. Ramalho A, Gelli D, Landgraf M, Destro M, Gombossy M. Detection of *Salmonella* in Foods Using Tecra Salmonella VIA and Tecra Salmonella UNIQUE Rapid Immunoassays and a Cultural Procedure. Journal of Food Protection. 2002;65:552-555.
52. Richardson RI, Mead GC. Ciencia de la carne de ave. Zaragoza, España. Acribia, 2001.
53. Rodríguez DC, Tauxe RV, Rowe B. International Increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic?. Epidemiol Infect 1990;105:21-27.
54. Scharank I, Mores M, Costa J. Frazzon A. Soncini R. Scharank Scharank A. Vainstein M. Silva S. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect Salmonella in poultry industry products and clinical samples. Veterinary Microbiology. 2001;82:45-53.
55. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Acuerdo mediante el cual se enlistan las plagas exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. México (DF), 1994.
56. Secretaria de Salud (SSA). Dirección General de Epidemiología. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. México DF.: SSA, 1995-1998. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/boletin.htm>

57. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. <http://www.sagarpa.gob.mx/>
58. Suárez H, Flores A, Puc F, Heredia N. Excreción de *Salmonella* en heces durante los tres primeros meses de vida. Revista latinoamericana de microbiología. 1991;33:245-247.
59. Talavera R. Análisis epidemiológico molecular de *Salmonella* spp. y su relación con la resistencia antibiótica en cerdos de abasto en rastros del valle de Toluca, México. (Tesis Doctoral). Colima (Colima). México: Universidad de Colima, 2004
60. Tan S, Gyles C, Wilkie B. Comparison of and LPS-specific competitive ELISA whit a motility enrichment culture method (MSRV) for detection of *Salmonella typhimurum* and *S. Enteritidis* in chickens. Veterinary Microbiology. 1997;56:79-86.
61. TECRA *Salmonella* Visual Immunossay. For the detection of *Salmonella* spp in food-related samples. Methods Manual 2004.
62. Tizard I. Inmunología Veterinaria 6a.ed.. Interamericana México. 2001.
63. Uribe C, Suárez M. salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de los alimentos de origen aviar. Colombia Médica. 2006;37:151-158.
64. Way SJ, et al. Specific Detection of *Salmonella* spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Applied and enviromental Microbiology. 1993;59:1473:1479.
65. Whyte P, Gil K, Collins J, Gormley E. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. Veterinary Microbiology. 2002;89:53-60.
66. Wray C, Wray A. *Salmonella* in domestic animals. Oxon, UK. CABI Publishing. 2000.

## CUADROS

**Cuadro 1. Categorías de los programas de muestreo**

		<b>Consideraciones de manipulación y consumo del alimento tras su muestreo.</b>		
		<b>Condiciones que reducen el riesgo</b>	<b>Condiciones que no modifican el riesgo</b>	<b>Condiciones que aumentan el riesgo</b>
<b>Sin riesgo directo para la salud. &lt;vida útil&gt;</b>	<b>Riesgo para la salud bajo, indirecto.</b>	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3
	<b>Moderado, directo, diseminación limitada.</b>	Categoría 4	Categoría 5	Categoría 6
	<b>Moderado, directo diseminación potencialmente extensa.</b>	Categoría 7	Categoría 8	Categoría 9
	<b>Grave, directo.</b>	<b>Categoría 10</b>	<b>Categoría 11</b>	<b>Categoría 12</b>
		<b>Categoría 13</b>	<b>Categoría 14</b>	<b>Categoría 15</b>

ICMSF, 1999.

**Cuadro 2. Tamaño de n y c, según las categorías.**

<b>Categoría</b>	<b>Programa</b>	<b>n</b>	<b>c</b>
1	3 clases	5	3
2	3 clases	5	2
3	3 clases	5	1
4	3 clases	5	3
5	3 clases	5	2
6	3 clases	5	1
7	3 clases	5	2
8	3 clases	5	1
9	3 clases	10	1
10	2 clases	5	0
11	2 clases	10	0
12	2 clases	20	0
13	2 clases	15	0
14	2 clases	30	0
15	2 clases	60	0

ICMSF, 1999.

**Cuadro 3. Determinación de PCC y OC**

Etapa	Peligro	Medidas preventivas	Árbol de decisión					¿Es un PCC?
			P1	Pa	P2	P3	P4	
Desplumado	<i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. Coli</i> . <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium perfringens</i> . Contaminación cruzada con el equipo.	BPM, POES (saneamiento operacional)	Si	-	No	Si	Si	No, es una OC
Pintado	<i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. Coli</i> . <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium perfringens</i> . Contaminación cruzada con el equipo.	BPM	No	Si	-	-	-	No, es una OC
Eviscerado	<i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. Coli</i> . <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium perfringens</i> .	BPM, POES (saneamiento operacional)	Si	-	No	Si	Si	No, es una OC
Lavado	Persistencia de <i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. Coli</i> . <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium perfringens</i> .	BPM	Si	-	Si	-	-	Si, es un PCC

P1. ¿Existen medidas preventivas en esta etapa?

Pa. ¿Es necesario el control en esta etapa para la inocuidad del alimento?

P2. ¿Esta etapa fue diseñada para prevenir, eliminar o reducir el riesgo?

P3. ¿Podría incrementarse el peligro hasta niveles inaceptables?

P4. ¿El peligro podrá eliminarse o reducirse a niveles inaceptables en una etapa posterior?

**Cuadro 4. Descripción de los lotes de canales de aves muestreados**

<b>Lote</b>	<b>Fecha</b>	<b>Procedencia de las aves</b>	<b>Etapas de muestreo</b>
1	22 mayo de 2006	Guanajuato	Escaldado, pintado, eviscerado y lavado.
2	29 mayo de 2006	Guanajuato y Jalisco	Escaldado, pintado, eviscerado y lavado.
3	05 junio de 2006	Guanajuato	Escaldado, pintado, eviscerado y lavado.
4	19 junio de 2006	Jalisco	Escaldado, pintado, eviscerado y lavado.
5	26 junio de 2006	Guanajuato	Escaldado, pintado, eviscerado y lavado.

**Cuadro 5. Primers empleados en la PCR multiplex**

<b>Secuencia de oligonucleotidos</b>	<b>Región amplificada (pb)</b>
<b><i>phoP</i></b>	
337-L,5´- ATGCAAAGCCCGACCATGACG-3´	299
338-R,5´-GTATCGACCACCACGATGGTT-3´	
<b><i>Hin</i></b>	
1750-L,5´-CTAGTGCAAATTGTGACCGCA-3´	236
1750-R,5´-CCCCATCGCGCTACTGGTATC-3´	
<b><i>H-li</i></b>	
1788-L,5´AGCCTCGGCTACTGGTCTTG-3´	173
1788-R,5´CCGCAGCAAGAGTCACCTCA-3´	

Way et al. 1993

**Cuadro 6. Casos de Fiebre Tifoidea, Paratifoidea y otras Salmonelosis en la Población General de Estados Unidos Mexicanos.**

<b>Padecimiento</b>	<b>Año</b>	<b>Casos totales</b>	<b>Tasa<sup>1</sup></b>
Fiebre Tifoidea	2005	31 790	29.86
	2004	25 952	24.63
	2003	20 239	19.4
Paratifoidea y otras salmonelosis	2005	109 536	102.90
	2004	109 444	103.89
	2003	103 815	99.6

<sup>1</sup> Por cada 100 000 habitantes.  
Secretaria de salud, 2003-2006.

**Cuadro 7. Muestras de canales de aves positivas a *Salmonella* spp en la PCR multiplex**

Lote	Procedencia	Etapa				total
		Desplumado	Pintado	Eviscerado	Lavado	
1	Guanajuato	1	2	4	-	<b>7</b>
2	Guanajuato y Jalisco	-	-	-	-	<b>0</b>
3	Guanajuato	-	-	-	-	<b>0</b>
4	Jalisco	1	-	2	1	<b>4</b>
5	Guanajuato	-	-	1	-	<b>1</b>
						<b>12</b>

**Cuadro 8. Matriz para la caracterización cualitativa del peligro**

<b>Severidad</b>				
<b>Alta</b>	AR	AB	AM	AA
<b>Media</b>	MR	MB	MM	MA
<b>Baja</b>	BR	BB	BM	BA
	<b>Remota</b>	<b>Baja</b>	<b>Media</b>	<b>Alta</b>
<b>Probabilidad de incidencia</b>				

- A) severidad o probabilidad de incidencia alta  
M) severidad o probabilidad de incidencia media  
B) severidad o probabilidad de incidencia baja  
R) severidad o probabilidad de incidencia remota

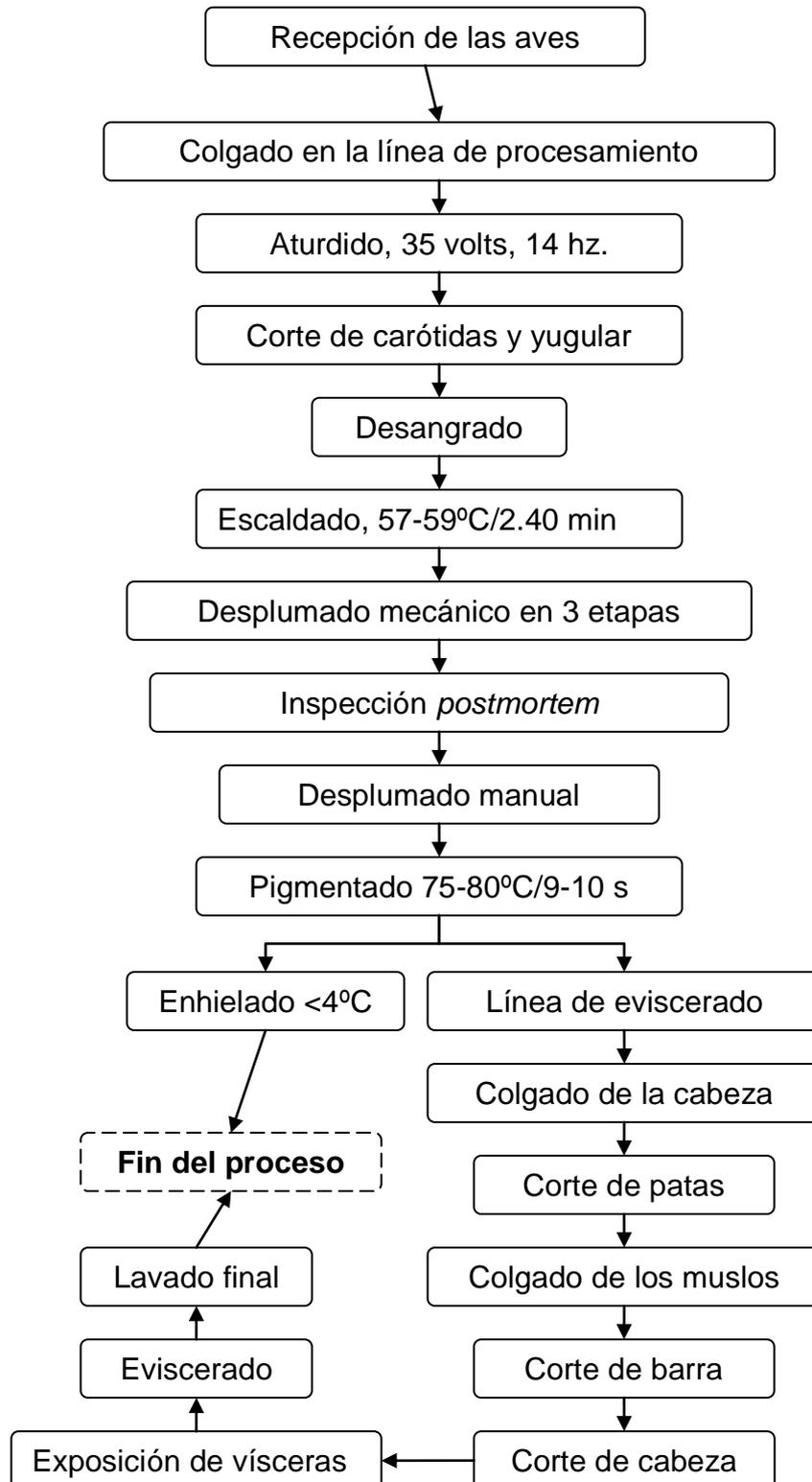
**Cuadro 9. Cepas utilizadas como controles en el PCR multiplex**

Cepa	Resultado en PCR		
	phoP	Hin	H-li
<i>Salmonella Typha</i>	+	+	+
<i>Salmonella paratyphi A</i>	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+
<i>Salmonella cholerasuis</i>	+	+	+
<i>Salmonella arizonae</i>	+	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	-	+
<i>Salmonella sp.</i>	+	+	-
<i>Salmonella pullorum</i>	+	-	-
<i>Salmonella gallinarum</i>	+	-	-

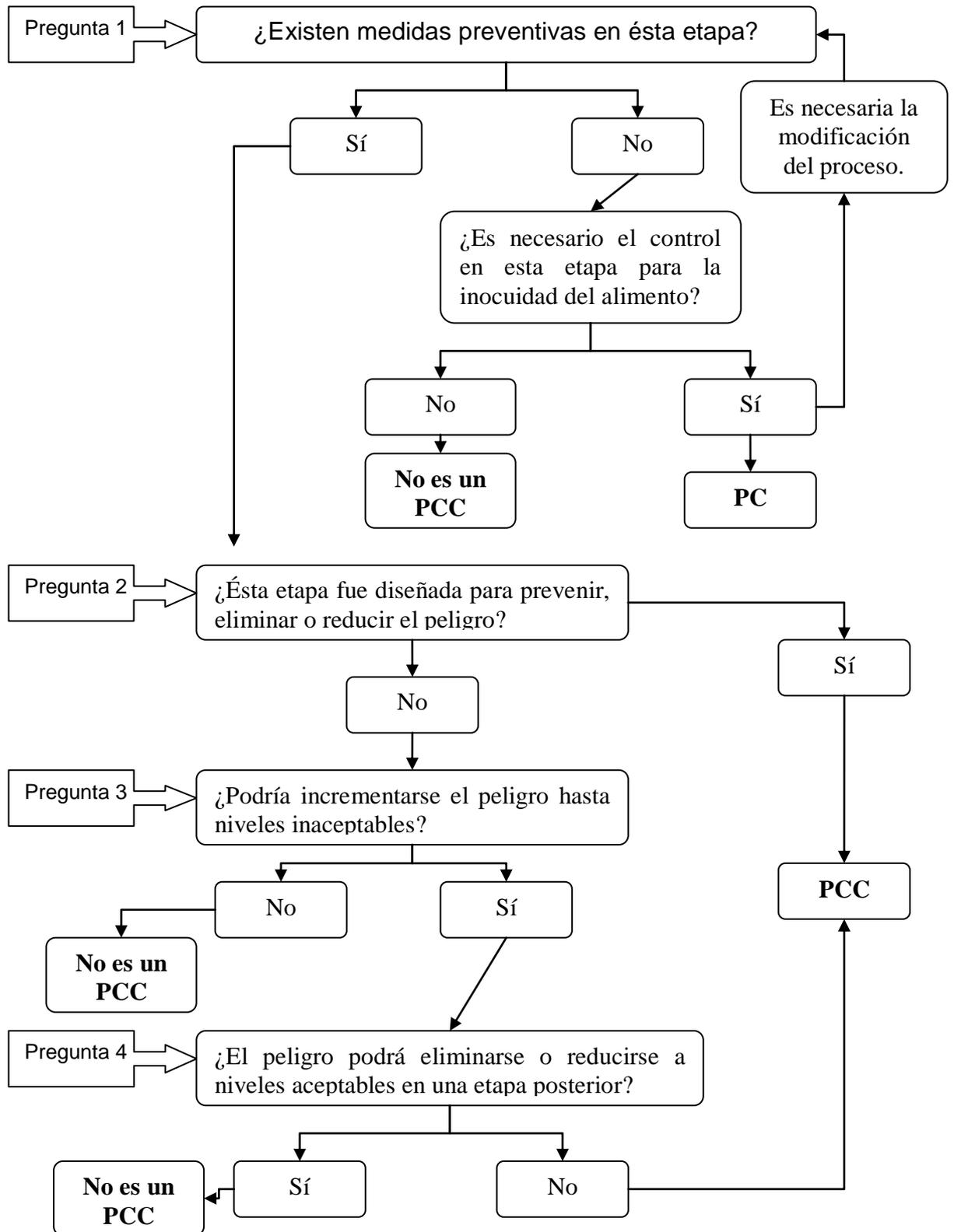
Way et al., 1993

## FIGURAS

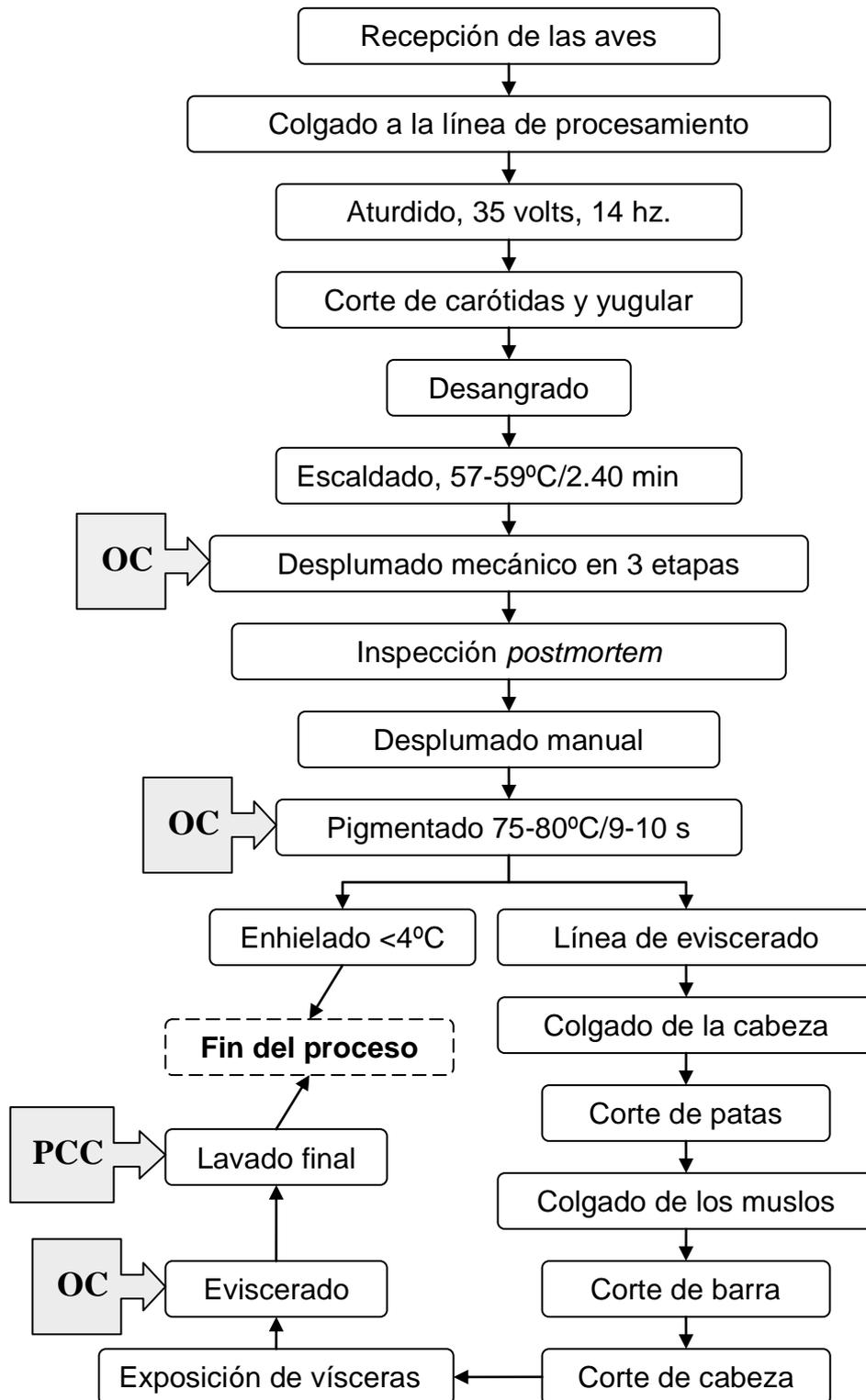
Figura 1. Diagrama de flujo *in situ* de las etapas de procesamiento de las aves.



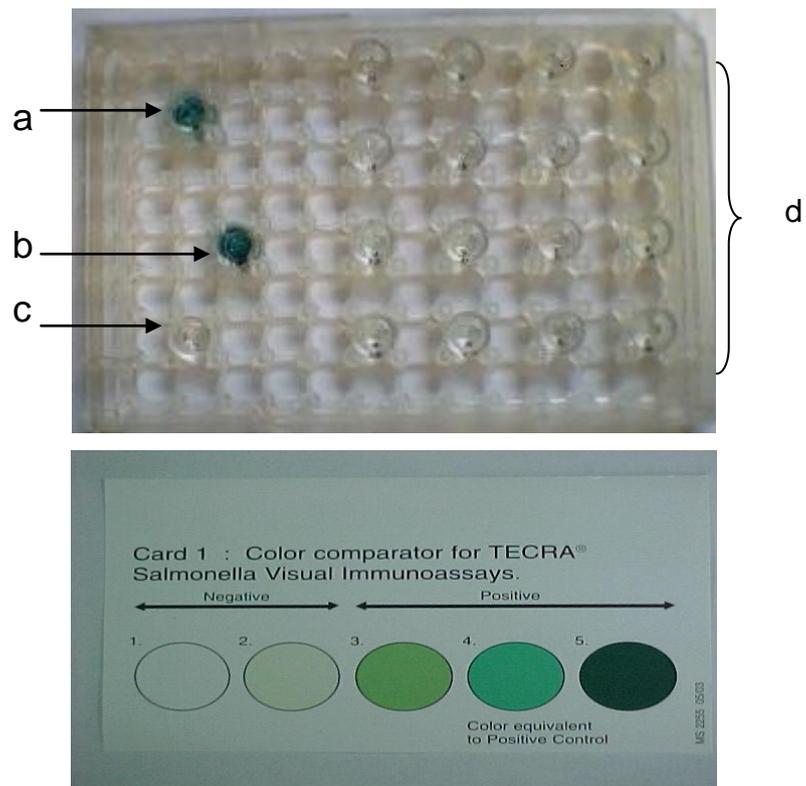
**Figura 2. Árbol de decisiones para determinar los Puntos Críticos de Control**



**Figura 3. Localización de los PCC y OC en el procesamiento**

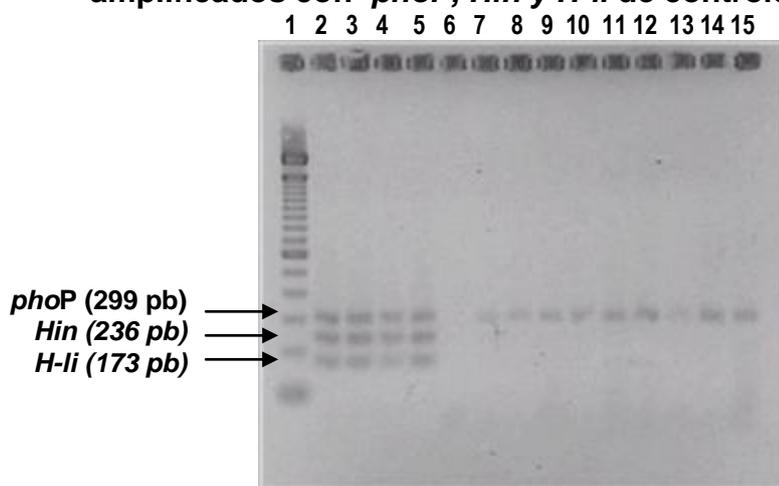


**Figura 4. Inmuenso con el kit TECRA**



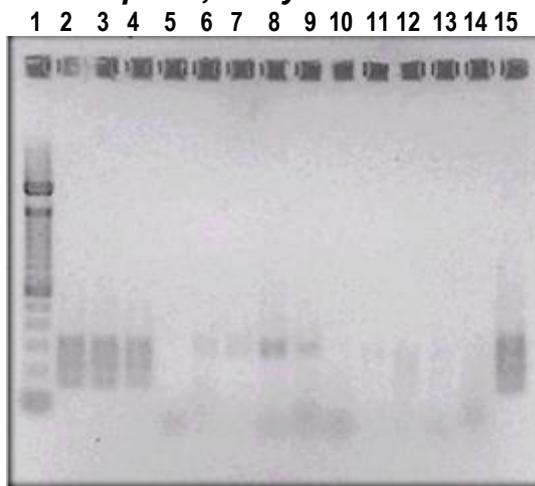
- a) Control positivo
- b) Cepa conocida de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis
- c) Control negativo
- d) Muestras correspondientes al lote 2

**Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li* de controles positivos**



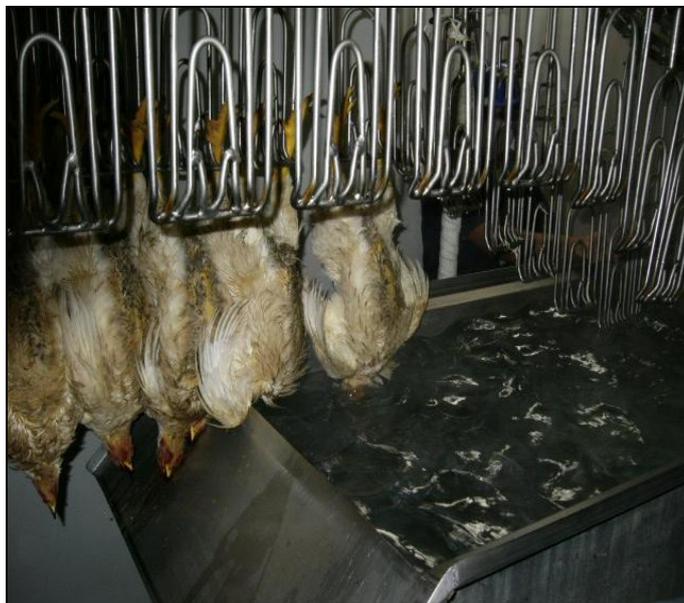
1) Marcador 100 pb. 2) *S* Tiphymurium 50 ng. 3) *S* Tiphymurium 10 ng. 4) *S* Tiphymurium 5 ng. 5) *S* Enteritidis 6) Blanco. 7-15 muestras que amplificaron con *phoP*.

**Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li* de controles positivos**



1) Marcador 100 pb. 2) S Tiphymurium 50 ng. 3) S Tiphymurium 10 ng. 4) S Tiphymurium 5 ng. 5) Blanco. 6-9 muestras positivas a enterobacterias, 10-14 muestras con ausencia de amplificación, 15) muestra positiva a *Salmonella* spp.

**Figura 7. Tanque de escaldado**



**Figura 8. Desplumado.**



**Figura 9. Tanque de pintado.**



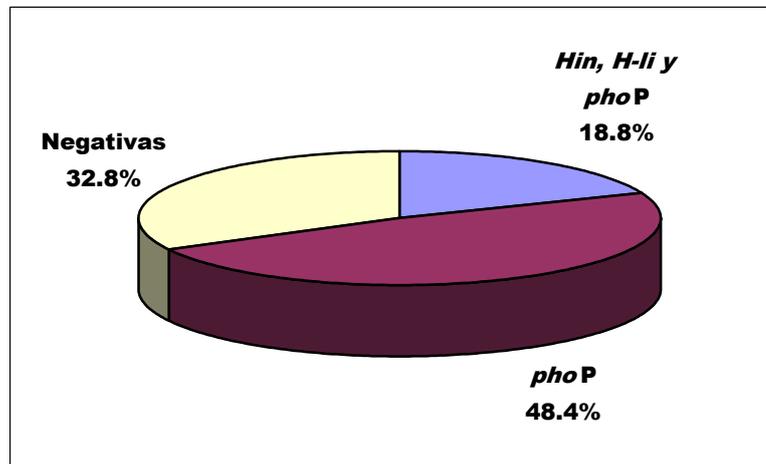
**Figura 10. Eviscerado.**



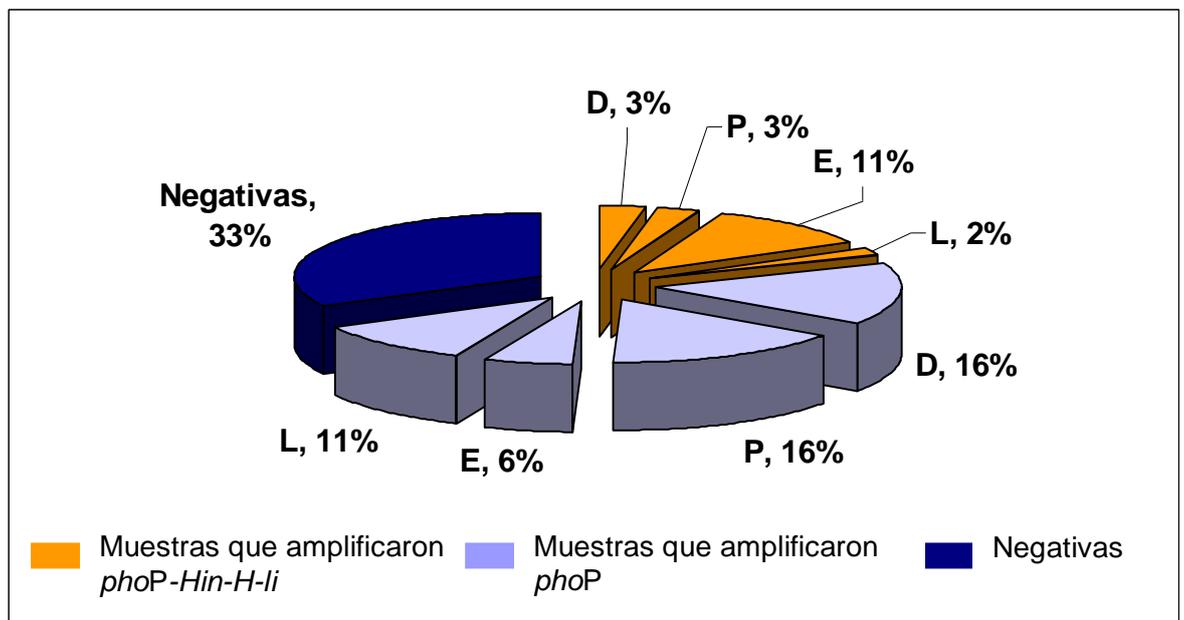
**Figura 11. Lavado de la canal.**



Figura 12. Resultados de PCR.

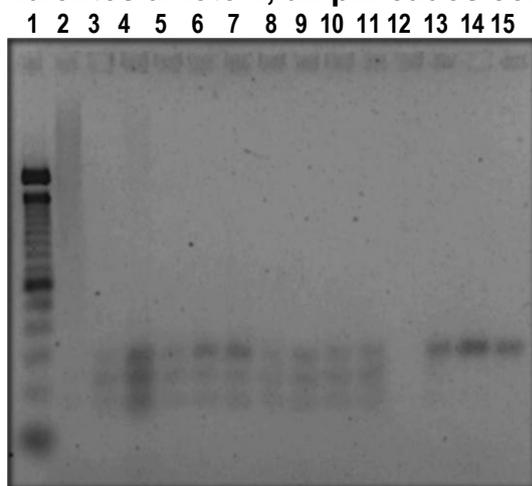


**Figura 13. Frecuencia de amplificación de los genes *phoP*, *Hin* y *H-li* según etapa del procesamiento.**



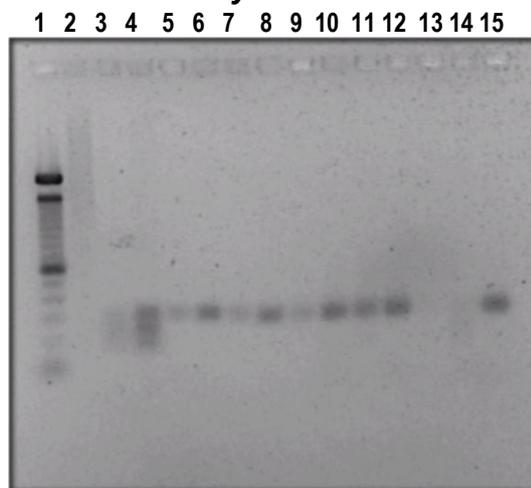
D) Desplumado. P) Pintado. E) Eviscerado. L) Lavado

**Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes al lote 1, amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li*.**



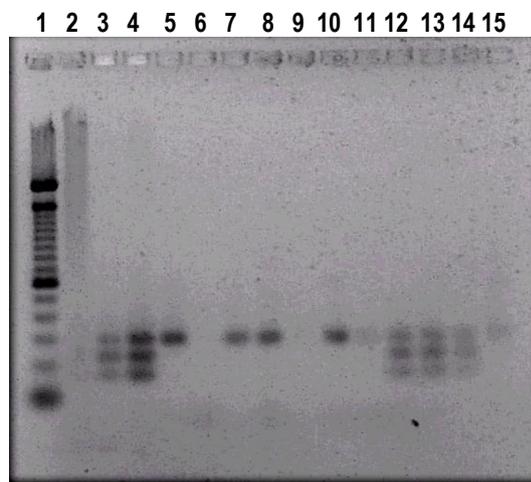
1) Marcador 100 pb. 2) Blanco, 3) *S* Typhimurium (ATCC 14028), 4) *S* Enteritidis. 5-11 muestras positivas a *Salmonella* spp. 12) muestra negativa a enterobacterias. 13-15 muestras con presencia de enterobacterias.

**Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes a los lotes 2 y 3, amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li*.**



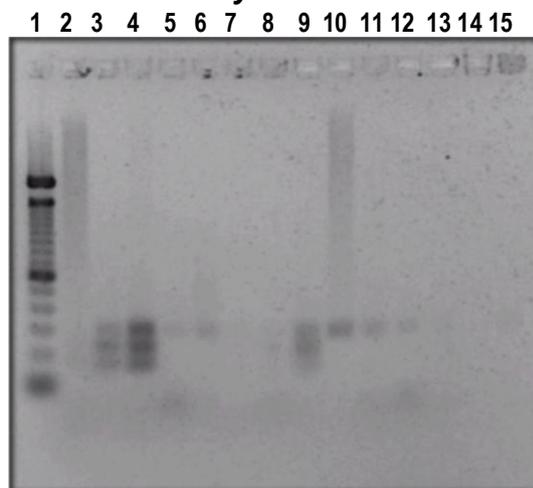
1) Marcador 100 pb. 2) Blanco 3) *S* Tiphymurium ATCC 14028. 4) *S* Enteritidis. 5-12 y 15 muestras con presencia de enterobacterias. 13 y 14 muestras negativas a enterobacterias.

**Figura16. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes a los lotes 3 y 4, amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li*.**



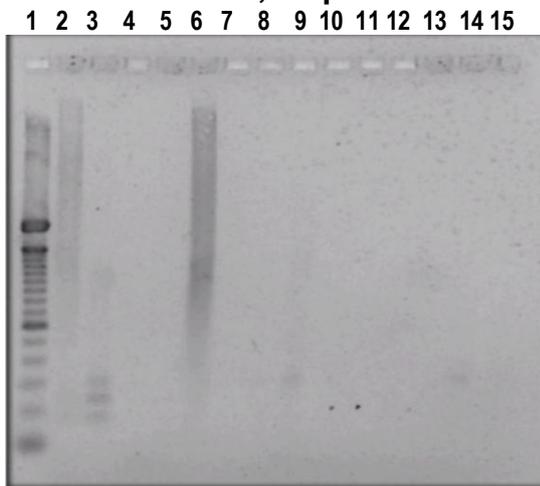
1) Marcador 100 pb. 2) Blanco 3) *S* Typhimurium ATCC 14028. 4) *S* Enteritidis. 5, 7, 8, 10, 11 y 15 muestras con presencia de enterobacterias. 6, 9 muestras negativas a enterobacterias. 12-14 muestras positivas a *Salmonella* spp.

**Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes a los lotes 4 y 5, amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li*.**



1) Marcador 100 pb. 2) Blanco 3) *S* Typhimurium ATCC 14028. 4) *S* Enteritidis. 5, 6 y 10-12 muestras con presencia de enterobacterias. 7, 8 y 13-15 muestras negativas a enterobacterias. 9) muestra positiva a *Salmonella* spp

**Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de muestras correspondientes al lote 5, amplificados con *phoP*, *Hin* y *H-li*.**



1) Marcador 100 pb. 2) Blanco 3) *S* Typhimurium ATCC 14028. 4-15 muestras negativas

## Anexo 1. Prueba Piloto

Se extrajeron 15 muestras preliminares de la población con el objetivo de identificar *Salmonella* spp. En las etapas del desplumado y pintado del pollo. Se tomaron 5 canales después del primer desplumado, 5 después del tercer desplumado y 5 después del pintado, para llevarse a cabo el aislamiento de *Salmonella* spp. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana 114-SSA1-1994, que establece el método de determinación de salmonera en alimentos.

Las muestras analíticas se obtuvieron por el método de lavado de la canal, (ICMSF, 1999.) a partir de las cuales se empleó el esquema general de la norma que se describe enseguida.

1) Preenriquecimiento. Consistió en adicionar 225 ml de caldo lactosado a 25 ml de agua de lavado, la mezcla se homogeneizó y se incubó a 37°C por 24 h.

2) Enriquecimiento. Un ml de preenriquecimiento se transfirió a 10 ml de caldo tetrionato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina, se incubó a 37 °C por 24 h.

3) Aislamiento en medios selectivos. Con cada tubo de enriquecimiento se estriaron placas de agar xilosa lisina desoxicolato, agar verde brillante y agar entérico hektoen, se incubaron a 37 °C por 24 hrs. Después de la incubación se examinaron las placas en búsqueda de colonias típicas de *Salmonella* spp.

4) Identificación bioquímica. Se seleccionaron dos colonias típicas de cada medio selectivo y se inocularon en tubos de agar triple azúcar hierro y agar hierro lisina, se incubaron a 37°C por 24 h.

No se observaron reacciones presuntivas positivas a *Salmonella* spp. en ninguna de los tubos, por lo que no se continuó con la identificación serológica.

## Anexo 2. Identificación serológica del control positivo

### Preparación y prueba de los antígenos “O” y “H” de *Salmonella* spp.

Se utilizó una cepa de *Salmonella* spp. proveniente de un aislamiento clínico de aves. La cepa fue confirmada por pruebas bioquímicas utilizando el sistema Vitek, se sembraron 5 réplicas en tubos de craigie de medio semisólido y se incubaron por 5 días a 37°C para confirmar la movilidad bacteriana.

Para la identificación del antígeno somático la cepa se sembró por estría continua en placas de TSA que se incubaron 24 h a 37°C. Se realizó una solución antigénica mediante una mezcla de 500 µL de solución salina, 20 µL de formaldehído y una asada de cultivo, que debió ser de superficie lisa, hasta formar una solución lechosa y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Se utilizó el suero *Salmonella O Factor 9* para confirmar la cepa de *Salmonella*; en una laminilla se colocaron 15 µL de la solución antigénica y 15 µL de suero, se mezclaron rotando suavemente la lámina durante 2 minutos, la reacción antígeno anticuerpo se expresa con aglutinación, el resultado se lee bajo luz directa. La aglutinación se puede presentar en diferentes grados, para una mejor asignación de calificación se emplea el siguiente criterio: de 100% a 75% de microorganismos aglutinados la calificación es 4+, 75% de microorganismos aglutinados 3+, 50% de microorganismos aglutinados 2+, menos de 25% de microorganismos aglutinados 1+ y la ausencia de aglutinación se asigna como una prueba negativa. Enseguida se probaron los sueros del complejo O (*gst*, *gp*, *Hm*, *Hp*, *t*, *fg*, *q*, y *f*), en una microplaca se colocaron 10 µL de cada suero (un pozo por cada diferente suero) y 100 µL de solución antigénica, los resultados de aglutinación se presentan en el cuadro 1.

*Salmonella* spp. es una bacteria móvil por poseer flagelos, su crecimiento en medio semisólido se expresa por turbidez del medio fuera de la varilla de vidrio y en la superficie del medio (figura 1), se tomó una azada de crecimiento bacteriano en este medio y se sembró por agitación de asa en caldo infusión

cerebro corazón (BHI) y se incubó 24 hrs. a 37°C. El antígeno flagelar “H” se inactivo mediante la adición 10 ml de solución salina formalizada (fenol 0.5%), los tubos se cubrieron con papel parafilm y se reservaron para su serotipificación. Se utilizó un sistema de antisueros flagelares para *Salmonella* spp. (Spicer-Edwards, DIFCO). Estructuralmente el flagelo esta conformado por un cuerpo basal, gancho y filamento, compuesto por flagelina, esta proteína tiene diversas variaciones en el contenido y ubicación de sus aminoácidos, la estructura primaria de la proteína le da su característica especificidad antigénica flagelar. La serotipificación permite identificar las fases flagelares 1 y 2 de *Salmonella* spp., la mayoría suelen poseer ambas fases (difásicas) y unas pocas sólo una de ellas (monofásicas). Cuatro sueros fueron utilizados para identificar la Fase 1 (Sueros 1, 2, 3 y 4) y cuatro para la Fase 2 (Sueros L, EN, I y PV), utilizando microplacas se mezclaron 10 µL de suero (un pozo por cada suero) con 100 µL de la solución del antígeno inactivado, la placa se incubó a 50°C durante 2 h. Posteriormente la placa se colocó bajo la luz de una lámpara para la lectura de resultados, que se presentan en el cuadro 2.

Los resultados de la prueba de los antígenos “O” y “H” indicaron que se trataba de una *Salmonella enterica* serovar Enteritidis con la siguiente formula antigénica: Serogrupo D, O9: gm: sin fase 2.

**Figura 1. Tubo de Craigie**



**Cuadro 1. Resultados de la prueba con sueros del complejo “O”**

	Serotipo O								
	<i>gst</i>	<i>Gp</i>	<i>Hm</i>	<i>Hp</i>	<i>T</i>	<i>fg</i>	<i>q</i>	<i>s</i>	<i>f</i>
<b>R1</b>	3+	3+	3+	-	-	3+	-	-	-
<b>R2</b>	3+	3+	3+	-	-	3+	-	-	-
<b>R3</b>	3+	3+	3+	-	-	3+	-	-	-
<b>R4</b>	3+	3+	3+	-	-	3+	-	-	-
<b>R5</b>	3+	3+	3+	-	-	3+	-	-	-

R) Réplicas de *Salmonella* spp.

**Cuadro 2. Resultados de la prueba en el sistema se sueros “H” de *Salmonella* (Spicer-Edwards)**

	Serotipo H							
	Fase 1				Fase 2			
	1	2	3	4	L	EN	I	PV
R1	3+	-	-	3+	-	-	-	3+
R2	3+	-	-	3+	-	-	-	3+
R3	3+	-	-	3+	-	-	-	3+
R4	3+	-	-	3+	-	-	-	3+
R5	3+	-	-	3+	-	-	-	3+

R) Réplicas de *Salmonella* spp.

### Anexo 3. Acta de 90 Puntos

#### COMISION FEDERAL PARA LA PROTECCION CONTRA RIESGOS SANITARIOS

##### DIRECCIÓN GENERAL DE CALIDAD SANITARIA DE BIENES Y SERVICIOS

###### I. PERSONAL DE ÁREA DE PROCESO.

- |   |     |   |     |
|---|-----|---|-----|
| 1. SE ENCUENTRA LIMPIO EN SU PERSONA E INDUMENTARIA DE TRABAJO.   | (2) | 4. NO USA JOYAS, ADORNOS U OTROS OBJETOS QUE REPRESENTEN RIESGOS, PARA EL PRODUCTO. (d)                           | (1) |
| 2. UTILIZA BATA, OVEROL O PANTALÓN Y CAMISOLA, CUBREPELO Y EN CASO NECESARIO CUBREBOCA, MANDIL, GUANTES Y BOTAS.  | (1) | 5. NO EXISTE EVIDENCIA DE QUE COME, BEBE, FUMA, MASCA, Y/O ESCUPE. EVITA TOSER Y ESTORNUDAR. (d)                  | (1) |
| 3. SE LAVA Y DESINFECTA LAS MANOS O GUANTES AL INICIO, REANUDACIÓN O TAN FRECUENTEMENTE COMO SEA NECESARIO DE ACUERDO A LA NATURALEZA DE SUS LABORES. (d) | (0) | 6. NO EXISTE PERSONAL CON HERIDAS O ENFERMEDADES DE LA PIEL, EN ÁREAS CORPORALES EN CONTACTO CON EL PRODUCTO. (d) | (2) |
|   |     | 7. TRAE LAS UÑAS LIMPIAS, RECORTADAS Y LIBRES DE BARNIZ. (d)  | (2) |

###### II. INFRAESTRUCTURA

###### 2.1 INSTALACIONES FÍSICAS Y SANITARIAS.

- |  |     |  |     |
|--|-----|--|-----|
| 8. LOS MATERIALES DE LA CONSTRUCCIÓN EXPUESTOS AL EXTERIOR SON RESISTENTES AL MEDIO AMBIENTE Y A PRUEBA DE ROEDORES.     | (2) | 13. LOS SANITARIOS CUENTAN CON AGUA CORRIENTE, RETRETES, LAVABOS, PAPEL HIGIÉNICO, JABÓN DESINFECTANTE, TOALLAS DESECHABLES O SECADOR DE AIRE Y RECIPIENTE PARA BASURA CON TAPA. | (1) |
| 9. SE ENCUENTRAN EN BUENAS CONDICIONES DE MANTENIMIENTO, LIBRES DE OBJETOS EN DESUSO Y AGUA ENCHARCADA.                  | (1) | 14. EXISTEN LETREROS VISIBLES INDICANDO AL PERSONAL QUE DEBE LAVARSE LAS MANOS DESPUÉS DE UTILIZAR LOS SANITARIOS. (c, d)  | (0) |
| 10. EXISTEN SEPARACIONES FÍSICAS ENTRE LAS DIFERENTES ÁREAS (PROCESO, SANITARIOS, LABORATORIO, COMEDOR, OFICINAS, ETC.). | (2) | 15. LAS DIFERENTES ÁREAS DE LA EMPRESA SE ENCUENTRAN LIMPIAS Y EN CASO NECESARIO DESINFECTADAS.  | (1) |
| 11. NO EXISTE ROPA U OBJETOS PERSONALES DENTRO DE LAS AREAS DE PROCESO. (c, d)   | (1) | 16. CUENTA CON UN ÁREA ESPECÍFICA ORDENADA Y LIMPIA, PARA ALMACENAR ARTÍCULOS DE LIMPIEZA, DETERGENTES Y DESINFECTANTES.   | (1) |
| 12. LOS SANITARIOS NO TIENEN COMUNICACIÓN, NI VENTILACIÓN HACIA EL ÁREA DE PROCESO.                                      | (2) |  |     |

###### 2.2. ÁREA DE PROCESO.

- |  |     |   |     |
|--|-----|---|-----|
| 17. LOS CLAROS, PUERTAS Y VENTANAS ESTÁN PROVISTAS DE PROTECCIÓN PARA EVITAR LA ENTRADA DE POLVO, LLUVIA Y FAUNA NOCIVA. | (1) | 19. LA UBICACIÓN Y LA INSTALACIÓN DE LOS EQUIPOS ES TAL QUE FACILITA LA LIMPIEZA DEL ESPACIO FÍSICO QUE LOS CIRCUNDA. (d) | (1) |
| 18. LAS PAREDES, PISOS Y TECHOS, PRESENTAN ACABADO SANITARIO QUE FACILITA SU LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN.                    | (1) | 20. CUENTA CON INSTALACIONES E IMPLEMENTOS PARA EL LAVADO Y DESINFECCIÓN DE LAS MANOS DEL PERSONAL.                       | (0) |
|  |     | 21. CUENTA CON INSTALACIONES PARA EL LAVADO Y DESINFECCIÓN  | (0) |

DE UTENSILIOS Y EQUIPOS.

## 2.3 SERVICIOS

22. CUENTA CON ABASTECIMIENTO DE AGUA POTABLE Y DEPÓSITO PARA SU ALMACENAMIENTO (CISTERNA, TINACO, ETC.). (1)
23. LOS DEPÓSITOS DE AGUA POTABLE ESTÁN REVESTIDOS DE MATERIAL IMPERMEABLE, CON ACABADO SANITARIO Y TAPA. (2)
24. LOS DEPOSITOS DE AGUA SE ENCUENTRAN LIMPIOS Y EN BUEN ESTADO DE MANTENIMIENTO. (2)
25. SE PRACTICA ALGÚN METODO PARA GARANTIZAR LA POTABILIDAD DEL AGUA Y DEL HIELO QUE ESTARÁN EN CONTACTO CON EL PRODUCTO O SUPERFICIES QUE LO CONTENGAN (CLORACIÓN, EBULLICIÓN, FILTRACIÓN, ETC.). (0)
26. EL AGUA NO POTABLE QUE SE UTILIZA EN LA PLANTA CON FINES NO RELACIONADOS CON EL PRODUCTO CORRE POR DUCTOS DIFERENTES E IDENTIFICADOS. (3)
27. LOS DUCTOS SE ENCUENTRAN EN BUEN ESTADO DE MANTENIMIENTO. (d) (1)
28. LOS DUCTOS NO SE ENCUENTRAN ENCIMA DE ÁREAS DE TRABAJO DONDE EL PRODUCTO ESTA EXPUESTO. (c, d) (1)
29. EL DRENAJE PRESENTA: DECLIVE SUFICIENTE PARA EVITAR ESTANCAMIENTOS Y ESTA PROVISTO DE REJILLAS Y COLADERAS CON TRAMPA PARA GRASA. (0)
30. CUENTA CON UN SISTEMA EFICIENTE DE EVACUACIÓN DE EFLUENTES CONECTADO A LOS SERVICIOS PÚBLICOS DE ALCANTARILLADO, FOSA SÉPTICA, ETC. (2)
31. LOS DRENAJES NO PRESENTAN FUGAS DE AGUAS SERVIDAS O MALOS OLORES. (2)
32. LA VENTILACIÓN ES LA APROPIADA PARA EVITAR CALOR EXCESIVO, CONDENSACIÓN DE VAPOR Y ACUMULACIÓN DE HUMO, POLVO Y OLORES. (1)
33. LA ILUMINACIÓN NATURAL O ARTIFICIAL ES SUFICIENTE PARA CADA ÁREA. (2)
34. LOS FOCOS QUE SE ENCUENTRAN EN ÁREAS DE PROCESO ESTÁN PROTEGIDOS PARA QUE EN CASO DE RUPTURA NO CONTAMINEN EL PRODUCTO. (c, d) (1)
35. EXISTENCIA DE UNA ZONA LIMPIA DESTINADA EXCLUSIVAMENTE PARA EL DEPOSITO TEMPORAL DE LOS DESECHOS. (1)
36. LOS DESECHOS SE COLOCAN EN RECIPIENTES ESPECIFICOS PARA TAL FIN, LIMPIOS, CON TAPA E IDENTIFICADOS. (1)

## 2.4 EQUIPO

- 37 EL EQUIPO Y UTENSILIOS USADOS ESTÁN LIMPIOS, Y DESINFECTADOS. (1)
38. EL EQUIPO E INSTRUMENTOS SE ENCUENTRAN EN BUENAS CONDICIONES DE MANTENIMIENTO Y OPERACIÓN, Y SON UTILIZADOS PARA EL FIN QUE FUERON DISEÑADOS. (1)
39. EL EQUIPO Y UTENSILIOS EN CONTACTO CON EL PRODUCTO PRESENTAN ACABADO SANITARIO QUE FACILITA SU LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN. (2)
40. EL EQUIPO Y UTENSILIOS EN CONTACTO CON EL PRODUCTO SON DE MATERIAL INOCUO. (2)

## III PROCESO

### 3.1. MATERIAS PRIMAS.

41. SU RECEPCIÓN SE REALIZA EN UN ÁREA ESPECIFICA, CUBIERTA Y LIMPIA; Y EN EL MENOR TIEMPO POSIBLE. (c, d) (1)
42. PARA SU ACEPTACIÓN SE REALIZAN PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD (TEMPERATURA, ANÁLISIS (1)
44. AUSENCIA DE MATERIAS PRIMAS QUE PUEDAN REPRESENTAR UN RIESGO A LA SALUD AL UTILIZARSE EN LA ELABORACIÓN DEL PRODUCTO. (1)
45. LAS MATERIAS PRIMAS SE ENCUENTRAN DENTRO DEL PERIODO (3)

- SENSORIAL, ETC.). (d)
43. ESTÁN CONTENIDAS EN RECIPIENTES ADECUADOS Y SE ENCUENTRAN DEBIDAMENTE IDENTIFICADAS. (3)
46. LAS MATERIAS PRIMAS DE IMPORTACIÓN OSTENTAN ETIQUETA EN ESPAÑOL. (3)

### 3.2 OPERACIÓN

47. LOS ENVASES DE MATERIAS PRIMAS QUE SE ENCUENTRAN EN ÁREA DE PROCESO ESTÁN LIMPIOS. (c, d) (3)
48. LA DESCONGELACION DE MATERIAS PRIMAS SE REALIZA DE MANERA QUE NO SE AFECTE LA CALIDAD SANITARIA DE LAS MISMAS. (b, d) (3)
49. NO EXISTE CONTACTO ENTRE MATERIAS PRIMAS, PRODUCTO EN PROCESO, TERMINADO O DESECHOS; QUE PUEDAN PROVOCAR CONTAMINACIÓN CRUZADA. (d) (1)
50. LOS DESECHOS QUE SE GENERAN DURANTE LA PREPARACIÓN SE COLOCAN EN RECIPIENTES LIMPIOS Y CUBIERTOS, Y SE ELIMINAN FRECUENTEMENTE. (d) (0)
51. DURANTE LA PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO SE CONTROLAN PARÁMETROS DEL PROCESO (pH, HUMEDAD, °BRIX, CONCENTRACIÓN DE DESINFECTANTES, ETC.). (d) (1)
52. DURANTE EL PROCESO DEL PRODUCTO SE CONTROLAN LAS VARIABLES CRITICAS DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN (TEMPERATURA, TIEMPO, PRESIÓN, ETC.). (d) (3)

### 3.3 ENVASADO.

53. LOS ENVASES SON EVALUADOS, Y EN CASO NECESARIO LAVADOS Y DESINFECTADOS ANTES DE SU USO. (0)
54. EL ENVASADO SE REALIZA EN CONDICIONES QUE EVITEN LA CONTAMINACIÓN DEL PRODUCTO (c, d) (0)
55. REALIZAN PRUEBAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PRODUCTO TERMINADO (SENSORIAL, Y/O FISCOQUÍMICO, Y/O MICROBIOLÓGICO). (0)

### 3.4 ALMACENAMIENTO.

56. CUENTA CON ÁREAS ESPECÍFICAS PARA ALMACENAMIENTO DE MATERIAS PRIMAS, PRODUCTO TERMINADO, EN CUARENTENA, DEVOLUCIONES, PRODUCTO RECHAZADO O CADUCO Y MATERIAL DE EMPAQUE. (0)
57. LOS ALMACENES CUENTAN CON TARIMAS Y/O ANAQUELES QUE FACILITAN EL ORDEN Y CONTROL DE LOS PRODUCTOS. (0)
58. EL ACOMODO DE LOS PRODUCTOS EVITA EL CONTACTO CON PAREDES Y TECHOS, PERMITIENDO UNA ADECUADA CIRCULACIÓN DEL AIRE, Y SU VERIFICACIÓN. (0)
59. LAS CONDICIONES AMBIENTALES EN LOS ALMACENES DE PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN REFRIGERACIÓN O CONGELACIÓN SON LAS CONVENIENTES PARA SU CONSERVACIÓN. (3)
60. LOS SISTEMAS DE REFRIGERACIÓN Y/O CONGELACIÓN ESTÁN PROVISTOS DE DISPOSITIVOS PARA CONTROL DE TEMPERATURA FUNCIONANDO CORRECTAMENTE. (0)
61. LAS MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS QUE REQUIEREN REFRIGERACIÓN SE MANTIENEN A UNA TEMPERATURA MENOR O IGUAL A 7°C. (0)
62. LAS MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS QUE REQUIEREN CONGELACIÓN SE MANTIENEN A UNA TEMPERATURA QUE NO PERMITE SU DESCONGELACIÓN. (0)

### 3.5 DISTRIBUCIÓN.

- 63.** LA CAJA DEL TRANSPORTE Y CONTENEDORES PRESENTAN ACABADO SANITARIO, Y SE ENCUENTRAN EN BUENAS CONDICIONES DE HIGIENE. (1)
- 64.** LA CAJA DEL TRANSPORTE ES CERRADA O CUENTA CON PROTECCIÓN CONTRA EL MEDIO AMBIENTE Y EN CASO NECESARIO CON REFRIGERACIÓN O CONGELACIÓN. (0)
- 65.** LOS VEHÍCULOS CON SISTEMA DE REFRIGERACIÓN O CONGELACIÓN CUENTAN CON REGISTRADORES DE TEMPERATURA. (c, d) (3)

### IV. CONTROL DE PLAGAS

- 66.** EXISTEN DISPOSITIVOS EN BUENAS CONDICIONES Y LOCALIZADOS ADECUADAMENTE PARA EL CONTROL DE INSECTOS Y ROEDORES (ELECTROCUTADORES, CEBOS, TRAMPAS, ETC.). (2)
- 67.** NO EXISTE EVIDENCIA DE FAUNA NOCIVA (INSECTOS, ROEDORES, AVES, ANIMALES DOMÉSTICOS, ETC). (1)
- 68.** LOS PLAGUICIDAS Y OTRAS SUSTANCIAS TÓXICAS SE ENCUENTRAN IDENTIFICADOS, ALMACENADOS EN UN ÁREA ESPECÍFICA Y SU MANEJO ES CONTROLADO. (d) (3)

### V. REVISIÓN DOCUMENTAL.

#### 5.1 MEDIO AMBIENTE.

- 69.** CUENTA CON EVIDENCIA DOCUMENTAL PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES. (a) (2)
- 70.** CUENTA CON EVIDENCIA DOCUMENTAL DE LA CAPACITACIÓN QUE SE DA AL PERSONAL. (a) (1)
- 71.** CUENTA CON PROCEDIMIENTOS, PROGRAMAS Y REGISTROS PARA LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LAS DIFERENTES ÁREAS Y EQUIPOS. (0)
- 72.** CUENTA CON REGISTROS DE ANÁLISIS PERIÓDICOS DEL AGUA POTABLE. (1)
- 73.** EN CASO DE UTILIZAR HIELO, CUENTA CON REGISTROS DE ANÁLISIS QUE DEMUESTREN QUE ES POTABLE. (a) (1)
- 74.** CUENTA CON GRÁFICAS O REGISTROS DE TEMPERATURAS DE LAS CÁMARAS DE REFRIGERACIÓN Y/O CONGELACIÓN. (0)
- 75.** CUENTA CON PROGRAMAS Y REGISTROS DE MANTENIMIENTO PREVENTIVO DE LOS EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS OPERACIONES CRÍTICAS. (a) (0)
- 76.** EXISTEN REGISTROS QUE DEMUESTREN QUE SE CONTROLA LA TEMPERATURA DE LOS PRODUCTOS DURANTE SU TRANSPORTE. (c, d) (3)
- 77.** CUENTA CON PROGRAMA Y REGISTRO PARA CONTROL DE FAUNA NOCIVA O CONSTANCIA DE ESPECIALISTAS QUE REALIZAN ESTA FUNCIÓN PERIÓDICAMENTE. (2)

## 5.2 CONTROL DEL PROCESO

<b>78. CUENTA CON ESPECIFICACIONES O CRITERIOS DE CALIDAD PARA LA ACEPTACIÓN DE MATERIAS PRIMAS Y REGISTROS QUE DEMUESTREN LA REALIZACIÓN DE PRUEBAS PARA SU CONTROL.</b>	(0)	<b>84. CUENTA CON DIAGRAMA DE FLUJO DE MATERIALES, PRODUCTOS Y PERSONAL, PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO DE CONTAMINACIÓN CRUZADA. (a)</b>	(0)
<b>79. CUENTA CON PROCEDIMIENTOS Y REGISTROS PARA ELIMINACIÓN, O TRATAMIENTO DE MATERIAS PRIMAS Y RETIRO DEL MERCADO DE PRODUCTOS QUE NO CUMPLAN ESPECIFICACIONES. (a)</b>	(0)	<b>85. CUENTA CON REGISTROS PARA EL CONTROL DE LAS VARIABLES CRÍTICAS DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN (GRÁFICAS, HOJAS DE CONTROL, ETC.).</b>	(0)
<b>80. CUENTA CON DOCUMENTACIÓN QUE GARANTICE QUE LOS ADITIVOS UTILIZADOS SON GRADO ALIMENTICIO.</b>	(3)	<b>86. CUENTA CON REGISTROS O CERTIFICADOS DE CALIBRACIÓN DE LOS INSTRUMENTOS PARA CONTROL DEL PROCESO (TERMÓMETROS, MANÓMETROS, ETC.). (a)</b>	(0)
<b>81. CUENTA CON ESPECIFICACIONES O CRITERIOS DE CALIDAD PARA LA ACEPTACIÓN DE ENVASES O DE LOS MATERIALES DE ENVASE Y REGISTROS QUE DEMUESTREN SU EVALUACIÓN.</b>	(3)	<b>87. LA ELABORACIÓN DE LOS PRODUCTOS SE CONTROLA POR ORDENES DE FABRICACIÓN O REGISTROS, A PARTIR DE LAS CUALES SE LOTIFICA.</b>	(1)
<b>82. CUENTA CON PROCEDIMIENTOS Y DIAGRAMAS DE BLOQUES PARA EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE SUS PRODUCTOS.</b>	(2)	<b>88. SE LLEVA CONTROL POR ESCRITO DE PRIMERAS ENTRADAS Y PRIMERAS SALIDAS (PEPS), PARA EVITAR MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS SIN ROTACIÓN.</b>	(3)
<b>83. CUENTA CON EL ANÁLISIS DE PELIGROS RELACIONADOS CON MATERIAS PRIMAS, PRODUCTO Y PROCESO. (a)</b>	(0)	<b>89. CUENTA CON REGISTROS DE ANÁLISIS DEL PRODUCTO TERMINADO.</b>	(0)
	(0)	<b>90. CUENTA CON REGISTROS PARA EL CONTROL DE SALIDAS Y DESTINO DE LOS PRODUCTOS POR LOTE.</b>	(0)

---

**TOTAL DE PUNTOS OBTENIDOS: 65**

1) Cumple parcialmente con lo establecido en la NOM-120. 2) Cumple plenamente con lo establecido en la NOM-120. 3) No aplica al rastro de aves.

**NO APLICA:** (a) para todos los establecimientos de bienes y servicios; (b) para establecimiento de fabricación y distribución de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas; (c) para establecimientos fijos de preparación de alimentos; (d) para establecimientos de fabricación, distribución y venta de productos belleza y cosméticos, y aseo y tabaco y venta al por menor de productos.