


<b>aoxlab</b>	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

# Procedimiento para la determinación de *Salmonella spp* por técnica tradicional

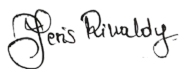


**AOXLAB S.A.S**

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

## DOCUMENTO CONTROLADO


### PROC-TC-024 Procedimiento para la determinación de *Salmonella spp* por técnica tradicional

Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
<b>Elaboró:</b>	Yeris Mercedes Rinaldy Mojica	Analista de microbiología		2025-05-03
<b>Revisó:</b>	Lorena Correa Restrepo	Líder de laboratorio		2025-05-05
<b>Aprobó:</b>	Jonatan Zárate Álvarez	Director técnico		2025-05-05
<b>Localización del documento:</b>		Plataforma SGC		


### Control de Cambios

Estado	Fecha de Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018-01-19	1	Ninguno (versión original).	LVLS	NBR	YELP
Obsoleto	2020-09-22	2	Actualización según manual identidad	YLCR YMRM	DPP	YELP
Vigente	2025-05-05	3	Se ajusta unidades, se organiza <i>Salmonella</i> en cursiva y se actualiza control calidad	YMRM	YLCR	JOZA

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

## Tabla de contenido

1.	OBJETIVO Y ALCANCE.....	4
1.1	OBJETIVO:.....	4
1.2	Alcance.....	4
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	4
2.1	Definiciones.....	4
2.2	Notaciones.....	5
3.	REFERENCIAS.....	5
4.	DESARROLLO.....	6
4.1	Actividades previas.....	6
4.1.1	Inspección de la muestra.....	6
4.1.2	Estabilización.....	6
4.1.3	Verificación de equipos y áreas de ensayo.....	7
4.1.4	Manejo de la muestra.....	7
4.1.5	Medidas de seguridad.....	7
4.2	Patrones y equipos de medición.....	8
4.3	Materiales y consumibles.....	8
4.4	Reactivos y/o soluciones:.....	8
5.	INSTRUCCIONES DE ENSAYO.....	9
6.4	Confirmación de colonias presuntivas aisladas.....	13
7.	Identificación bioquímica usando kit comercial.....	14
8.	INFORME.....	14
9.	Aseguramiento de la calidad.....	14
<b>10</b>	<b>RESPONSABILIDADES.....</b>	<b>14</b>
<b>10.1</b>	<b>Director técnico.....</b>	<b>14</b>
<b>10.2</b>	<b>Líder de Calidad.....</b>	<b>14</b>
<b>10.3</b>	<b>Líder de Laboratorio.....</b>	<b>15</b>
<b>10.4</b>	<b>Analista.....</b>	<b>15</b>
<b>11.</b>	<b>FORMATOS RELACIONADOS.....</b>	<b>15</b>
<b>12</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>16</b>
	No aplica.....	16

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

## 1. OBJETIVO Y ALCANCE

### 1.1 OBJETIVO:

Describir el método para el aislamiento e identificación de *Salmonella spp* por ausencia/presencia

### 1.2 Alcance


Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Determinar la presencia/ausencia de <i>salmonella spp</i>	ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020	Método horizontal Presencia/Ausencia

Esta técnica aplica para los siguientes productos: Productos cárnicos (crudos, cocido, madurado); aves (crudo, cocido); pescados y productos alimenticios marinos (crudos, cocidos); productos de frutas y a base de vegetales (crudos) productos lácteos (crudos, congelados, secos, procesados); productos de chocolate y panadería; misceláneos (salsa, huevos y derivados, enriquecidos, precocidos, deshidratados).

## 2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

### 2.1 Definiciones

***Salmonella spp.*[4]:** es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Aunque los miembros de este género son capaces de moverse por medio de flagelos peritricos, existen variantes no móviles, *S. entérica serovar Pullorum* y *S. entérica serovar Gallinarum*, así como cepas no móviles debido a la presencia de flagelos disfuncionales. Las especies de *Salmonella* son quimioorganótrofas, con habilidad para metabolizar nutrientes por las vías fermentativa y respiratoria. Las bacterias crecen óptimamente a 37°C y pueden catabolizar la D-glucosa y otros carbohidratos con producción de ácido y gas. Estos microorganismos son oxidasa negativos y catalasa negativos, crecen en citrato como única fuente de carbono, generalmente producen ácido sulfhídrico, descarboxilan la lisina y ornitina, y no hidrolizan la urea. La mayoría de estas características se utilizan para la identificación bioquímica de cepas aisladas de *Salmonella*.

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

Su temperatura optima de crecimiento es de unos 37°C y la aw mínima es aproximadamente de 0,93. el intervalo de pH de crecimiento está comprendido entre los valores de 4.1 y 9.0 multiplicándose, por lo tanto, en los alimentos de baja acidez.

**Análisis microbiológico** [1]: Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

**Límites microbiológicos** [1]: Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.

**Incubadora** [1]: cámara aislada que permite que la temperatura se mantenga estable y uniformemente distribuida dentro del rango de error de temperatura máximo permisible especificado en el método de ensayo.

**Calibración** [3]: Proceso de comparar los valores obtenidos por un instrumento de medición con la medida correspondiente de un patrón de referencia (o estándar).

## 2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

**“Laboratorio”**: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

**“Informe de resultados”**: se refiere a los informes de ensayo que emite el Laboratorio.

**“Servicios”**: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.


## 3. REFERENCIAS

[1] NTC 4092:2009 Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos-

[2] Vocabulario internacional de metrología: conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 1er edición en español, 2008

[3] NTC 4574: Microbiología. método horizontal para la detección de *Salmonella* en alimentos.

[4] Norma ISO 6579-1:2017/Amd. 1:2020 o versión vigente “Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*”. Part 1: Detection of *Salmonella spp*.

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

[5] Norma ISO 6887-1:2017- Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para el examen microbiológico. Parte 1: Normas generales para la preparación de la suspensión inicial y de las diluciones decimales.

[6] ISO 7218:2008, Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations

[7] ISO 11133:2014, Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

## 4. DESARROLLO.

### 4.1 Actividades previas.

#### 4.1.1 Inspección de la muestra.


Al recibirse la muestra en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se garantizan las condiciones conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-008 "Procedimiento de aseguramiento de integridad de los ítems bajo servicio". Antes de iniciar el análisis, se debe verificar que la muestra se encuentra empacada y sellada herméticamente, y etiquetada con el sticker de identificación interna del laboratorio. Que las muestras que requieran refrigeración se entreguen en neveras con pilas de hielo. Se debe contar con al menos 20 gramos de muestra para realizar este análisis. En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

#### 4.1.2 Estabilización.

Una vez revisada la muestra, se aplican las siguientes instrucciones:

Los patrones y equipos de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo como son las balanzas se mantienen en el lugar de ensayo encendidas, antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Las muestras que están en congelación deben retirarse del congelador y atemperarse hasta que adquieran un estado adecuado para realizar la toma de la porción analítica. Los ítems que no requieren refrigeración se mantienen en el lugar de ensayo para que tengan una estabilidad térmica. Las soluciones usadas para el ensayo deben atemperarse por 1 hora, e o colocarlas entre 15 y 20 minutos en la incubadora a 37 °C.

Debe verificarse que las condiciones ambientales del lugar de ensayo se encuentren en los intervalos que se muestran a continuación:

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	18,00	25,00	Condiciones establecidas por el laboratorio
Humedad relativa	20,00	80,00	Condiciones establecidas por el laboratorio

Estas condiciones son monitoreadas y registradas automáticamente por el software 3sense del laboratorio y en caso de que se encuentren fuera de estos rangos deben suspenderse los análisis y se debe informar al líder de mantenimiento, líder de laboratorio y dirección técnica

#### 4.1.3 Verificación de equipos y áreas de ensayo

A fin de confirmar que los equipos a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se inspecciona que se haya realizado la verificación diaria de la balanza gramera de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-005.


Así mismo, se debe garantizar la desinfección de la cabina y encendiendo la fuente de luz UV durante por lo menos 60 minutos. Antes de cada ensayo, debe verificarse que se haya realizado la limpieza y desinfección de mesones e implementos a utilizar de acuerdo con el procedimiento PROC-TC-031 y la correcta limpieza y desinfección de los materiales, siguiendo las directrices establecidas en los procedimientos PROCTC-026 y PROC-TC-027.

#### 4.1.4 Manejo de la muestra.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y descarte de la muestra, se siguen las instrucciones dadas en el procedimiento PROC-TC-008 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio. Al tomar de la porción de análisis, la muestra debe estar a temperatura ambiente y correctamente homogeneizada.

#### 4.1.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las siguientes medidas de seguridad antes y durante la realización del servicio: Verificar que el sticker de calibración y mantenimiento de los equipos (Incubadoras, balanzas) se encuentren vigentes y no requiere alguna intervención. Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio" y Verificar que ninguno se encuentre vencido. En caso de que se encuentre alguna anomalía al respecto, avisar a la Dirección Técnica a través del Líder de Laboratorio.

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <a href="#">PROC-TC-024</a>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

Antes de realizar los ensayos, debe tenerse en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún paso. Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC- 015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIV.

#### 4.2 Patrones y equipos de medición.

Para realizar el ensayo se utilizan los siguientes equipos y componentes clave:

- Balanza gramera con resolución de 0.1 g
- Vortex
- Transfer pipeta de 1000 µl
- Transfer pipeta de 100 µl
- Baño de agua a 41.5 °C
- Cabina flujo laminar
- Incubadora entre 35-37°C
- Stomacher
- Diluctor gravimétrico con resolución de 0.1 g

#### 4.3 Materiales y consumibles


- Puntas para transfer pipeta de 1000 µL
- Puntas para transfer pipeta de 100 µL
- Bolsas whirl pak estériles
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Cajas de Petri plásticas estériles de 90 a 100 mm
- Asa de aro de 10µl esteriles
- Probeta de 250 mL
- Kit de identificación bioquímica API 20E
- Placa portaobjetos
- Tirilla indicadora de oxidasa

El material reutilizable debe haber sido previamente lavado, secado y esterilizado (**Ver PROC-TC 026-027**)

#### 4.4 Reactivos y/o soluciones:

Se deben preparar de acuerdo al PROC-TC-206: Pprocedimiento de preparación de soluciones y medios de cultivo

- Agua peptonada tamponada ISO standard 6579
- Agar Xilosa lisina desoxicolato (XLD)

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

- Agar hektoen (Hek)
- Caldo Rappaport Vassidialis (RVS). Tubos tapa rosca x 10 mL.
- Caldo Tetrionato Muller- Kauffmann con Novobiocina (TTMKn). Tubos tapa rosca x 10 mL.
- Agar Plate count (PCA)
- Peróxido de hidrogeno al 30%
- Solución salina al 0.85%.
- Solución de Yodo-yoduro.
- Etanol 70%.
- Reactivo Kovac's

Preparados según "Procedimiento para la preparación de soluciones y medios de cultivo" PROC-TC- 206


- Control positivo: Suspensión bacteriana de *Salmonella* ATCC de aproximadamente 10-80 UFC
- Control negativo: Suspensión bacteriana de *Escherichia coli* ATCC de aproximadamente 10-80 UFC

Preparadas según PROC-TC-207 "Procedimiento para la preparación de suspensiones microbianas

## 5. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

### 5.1 Preparación de soluciones y reactivos

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Solvente	Observaciones
Agar XLD	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 mL por cada caja de Petri.
Agar Hektoen	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 mL por cada caja de Petri.
Agar Bismuto Sulfito	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 mL por cada caja de Petri.
Caldo Rappaport Vassidialis (RVS)	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar en tubos de 10 mL
Caldo Tetrionato Muller- Kauffmann	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar en tubos de 10 mL

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

con Novobiocina (TTMKn)			
Solución de Yodo-yoduro	2 mL de Yodo-Yoduro	100 mL de agua destilada estéril	Adicionar 0.2 mL de la solución por cada 10 mL de medio TTMKn en tubos. Adicionar el suplemento inmediatamente antes de inocular la muestra pretratada.
Agar PCA	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 mL por cada caja de Petri.
Agua Peptonada tamponada estéril	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar en frasco 1000 mL por cada muestra.


Registrar la preparación de estas soluciones en el FOR-TC 045 en la plataforma analítica

## 6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO

### 6.1 Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

- Pesar asépticamente en el diluctor gravimétrico o en su defecto en una balanza gramera (prendiendo un mechero al lado de la balanza) en una bolsa whirl pak 25 gramos o mililitros del producto a analizar, añadir 225 mL de agua peptonada tamponada para obtener una dilución 1:10.
- Llevar al stomacher por 1 minuto. Si el volumen de la suspensión supera la capacidad de la bolsa contenedora, se recomienda suspender la mitad del volumen del diluyente (sin tarar el peso obtenido) para llevar al stomacher para su homogenización y luego completar el volumen requerido para obtener la dilución deseada. De esta manera se garantiza una óptima homogenización.
- Incubar a una temperatura de  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  ( $34^{\circ}\text{C}$  a  $38^{\circ}\text{C}$ ), durante  $18 \pm 2$  horas.
- Reportar los pesos en el FOR-TC-075 "Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos".
- Se puede almacenar esta muestra pre-enriquecida después de la incubación, a  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  por un máximo de 72 horas.

**Nota:** Para el pre-enriquecimiento de muestras con pesos superiores a 25g de muestra, incluidos matrices ambientales, se puede seguir los protocolos descritos en el numeral 4.2.5 del PROC-TC-165 "Procedimiento para detección molecular de *Salmonella spp*", los cuales están validados por la AOAC 2016.01.


	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

## 6.2 Enriquecimiento en medios líquidos selectivos

- Deje que los tubos de caldos selectivos se equilibren a temperatura ambiente y rotule cada tubo por código de muestra.
- Homogenice cuidadosamente de forma manual los caldos de pre-enriquecimiento y reserve durante 1 minuto.
- Transferir 0.1 mL del caldo de pre-enriquecimiento no selectivo a un tubo que contiene 10 mL de Caldo RVS y 1 mL en caldo TTMKn, el cual debe haber sido previamente adicionado con 0.2 mL de solución de Yodo-yoduro.
- Incubar los cultivos de caldo RVS a  $41.5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y a  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  los cultivos en Caldo TTMKn durante  $24 \pm 3$  horas.
- Se puede almacenar los cultivos de enriquecimiento selectivos después de la incubación, a  $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$  por un máximo de 72 horas.

## 6.3 Enriquecimiento en medios sólidos selectivos


- Deje que las placas de agares selectivos se equilibren a temperatura ambiente y rotule en la parte inversa de las placas por código de muestra.
- Homogenizar en vortex durante 5 a 10 segundos los tubos que contienen los cultivos selectivos enriquecidos (obtenidos en el numeral 6.2).
- El aislamiento selectivo en medios sólidos se realiza en agar XLD, y como medio opcional escogido por el laboratorio es el Agar Hektoen (Hek) o Bismuto Sulfito (BS).  
 Aislar por agotamiento con asa estéril de 10  $\mu\text{l}$  el cultivo obtenido en caldo RVS utilizando dos placas una de XLD y otra de agar Hektoen. Use la misma asada para sembrar las dos cajas una después de la otra, de modo que se obtengan las colonias bien aisladas. Repetir el procedimiento con el subcultivo del caldo TTMKn.
- Invertir las cajas e incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  las placas sembradas, durante  $24 \pm 3$  horas.

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

### DIFERENCIACIÓN DE LAS U.F.C. TÍPICAS DE *Salmonella spp*

**Tabla 1:** Colonias típicas de *Salmonella spp.* en medios sólidos selectivos.

MEDIO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS U.F.C. TÍPICAS	IMÁGENES
AGAR HEKTOEN	Verdes azulados con o sin centro negro por producción de H <sub>2</sub> S	
AGAR BISMUTO SULFITO	Colonias marrones, grises o negras generalmente con brillo metálico 24 horas se vuelven uniformemente negro uniforme a las 48 horas	
AGAR XLD	Del mismo color que el medio de cultivo, transparentes; a veces con centro negro (H <sub>2</sub> S). Salmonella lactosa positivas: amarillas con o sin ennegrecimiento Salmonella H <sub>2</sub> S negativas: rosas con un centro rosa más oscuro	

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

#### 6.4 Confirmación de colonias presuntivas aisladas.

Se toma de cada placa de medio selectivo por lo menos una colonia que sea considerada típica o sospechosa y una colonia atípica. Sembrar las colonias aisladas y purificadas en placas de agar Tripticasa de soja o Plate count. Incubar las placas inoculadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  a  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  y proceder a su identificación, utilizando cepas puras para la confirmación bioquímica.

Las colonias aisladas se les realiza confirmación por pruebas bioquímicas y/o serológicas, pueden utilizarse los sistemas de identificación disponibles en el comercio siguiendo las instrucciones del fabricante. Se debe realizar prueba de indol, oxidasa y catalasa.

##### 6.4.1 Prueba de indol:

Tomar 2 colonias y transferirlas a un tubo que contiene agua peptona con triptófano, adicionar entre 4-8 gotas de reactivo kovac's y observar presencia de coloración del anillo: la reacción es positiva si el anillo es de color rojo cereza y es negativa si el anillo es amarillo-marrón. *Salmonella* es indol negativo.

##### 6.4.2 Prueba de oxidasa:

Tomar una tirilla indicadora de oxidasa, poner sobre una colonia sospechosa durante 20-60 segundos y observar coloración en la tirilla, la reacción es positiva si la tirilla toma color morado o purpura y si es negativa la coloración es amarilla. *Salmonella spp* es oxidasa negativa.


##### 6.4.3 Prueba de catalasa:

Tomar 2 colonias sospechosas o típicas, extender sobre una placa portaobjetos y adicionar 1-2 gotas de peróxido de hidrogeno. La reacción es positiva si hay presencia de burbujas. *Salmonella spp* es catalasa positiva.

**6.4.4 Tinción Gram:** Tomar la colonia con el asa bacteriológica previamente esterilizada, encendiendo el mechero de alcohol y ponemos el asa en posición vertical encima del mechero hasta que el hilo del extremo del asa se quede totalmente incandescente.

Esperar a que se enfríe porque si tocamos con el hilo incandescente las colonias podemos matar al microorganismo. Abrimos la placa con las bacterias y con el asa tocamos en el agar para comprobar que éste está frío.

Tomar unas colonias de las bacterias y las extendemos sobre la gota de agua destilada en un portaobjeto, fijar la muestra con calor pasando el portaobjetos sobre un mechero haciendo movimientos circulares o en zig zag por encima de la llama del mechero, levantando constantemente la muestra para que no se nos queme, se pasa el tiempo suficiente para que la muestra quede totalmente seca y por lo tanto fijada.

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

Se procede a realizar la tinción de acuerdo con el PROC-TC-078 "Procedimiento para tinción de Gram en microbiología" Después de mirar al microscopio se observa:

- Si las bacterias son Gram positivas (color púrpura) o Gram negativas (color rosado)
- Forma que presentan -redondeadas (cocos) o en forma de bastoncillo (bacilos)

## 7. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA USANDO KIT COMERCIAL

A partir de las colonias puras aisladas en el numeral 6.4, se procede a realizar la caracterización de cepas de *Salmonella spp*, siguiendo las instrucciones del PROC-TC-236 "Procedimiento para la identificación bioquímica de enterobacterias por el sistema API 20E.

## 8. INFORME

Después de realizar las pruebas confirmativas de *Salmonella spp* se reportará como Ausencia o Presencia de *Salmonella spp* en 25g o mL de muestra, o en 375 g de acuerdo con lo requerido, en el FOR-TC-075 "Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos", en la plataforma analítica

## 9. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD


Para asegurar y controlar la validez de los resultados, se debe realizar controles positivos y negativos una vez a la semana variando la matriz, usando como control positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y como control negativo *Escherichia coli* ATCC 25922 por cada lote preparado del medio para verificar que si tenga recuperación del microorganismo evaluado. Así mismo, en cada lote de medio preparado, se debe realizar un control de esterilidad.

## 10 RESPONSABILIDADES.

### 10.1 Director técnico.

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Revisar y aprobar los informes técnicos una vez han sido revisados por el Líder de Laboratorio.
- Asesorar y orientar los analistas en la resolución de dudas e inconvenientes surgidos durante el desarrollo de los ensayos.
- Realizar o revisar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método y autorizar las indicaciones a seguir.
- Establecer los casos en los cuales se realiza la retención de muestras.

### 10.2 Líder de Calidad.

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b> <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> PROC-TC-024
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> 2025-05-05

- Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.
- Realizar y registrar las investigaciones pertinentes a los trabajos no conformes derivados de la ejecución del método.
- Archivar los registros técnicos relacionados con los ensayos.

### 10.3 Líder de Laboratorio.


- Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.
- Revisar los resultados ingresados por el analista, haciendo seguimiento de la trazabilidad del análisis (Cuadros de mando, formato de solicitud de servicio y salvaguardia de muestras, formatos de datos primarios) antes de enviar el informe final al director técnico.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al director técnico las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder de calidad y al director técnico.
- Informar los casos en los que se deben de retener las muestras.
- Supervisar el cumplimiento de las actividades de aseguramiento de calidad.

### 10.4 Analista.

- Seguir todas las instrucciones establecidas en este procedimiento y en el reglamento del laboratorio
- Ingresar y entregar todos los resultados en los tiempos pactados.
- Entregar formatos de datos primarios completamente diligenciados al líder del laboratorio.
- Realizar revisión de datos primarios y cálculos realizados en los cuadros de mandos, informar al líder del laboratorio en caso de observar alguna desviación en los resultados obtenidos teniendo en cuenta las cartas control.
- Registrar los resultados de los ensayos de control de calidad y hacer el análisis de tendencias de estos.
- Realizar la revisión de resultados teniendo en cuenta la normativa vigente si esta aplica.
- Informar al líder de laboratorio las desviaciones que se den durante el desarrollo del método.
- Reportar y registrar los trabajos no conformes derivados del análisis al líder del laboratorio.
- Informar cualquier incidente que suceda durante la realización del método.
- Revisar que los equipos usados en el desarrollo del método tengan mantenimiento, calibración y/o verificación vigente, de acuerdo con el programa de mantenimiento y calibración.

## 11. FORMATOS RELACIONADOS.

FOR-TC-075 "Formato para el registro de datos primarios de análisis microbiológicos"

	<b>Procedimiento para la determinación de <i>Salmonella spp</i> por técnica tradicional</b>  <b>AOXLAB S.A.S</b>	<b>Identificación:</b> <a href="#">PROC-TC-024</a>
		<b>Revisión:</b> 3
		<b>Inicio de vigencia:</b> <a href="#">2025-05-05</a>

SOFT-TC-048 "Cuadro de mando para ensayos microbiológicos cualitativos"

FOR-TC-045 "Formato para el registro de información y asignación de lote de las soluciones preparadas para uso en los ensayos."

**12 ANEXOS.**

No aplica