


aoxlab	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Procedimiento para la detección molecular de *Salmonella spp.*

AOXLAB S.A.S

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

DOCUMENTO CONTROLADO


PROC-TC-165 Detección molecular de *Salmonella spp*

Copia controlada No. :1


	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yeris Mercedes Rinaldy Mojica	Líder microbiología		2025-10-13
Revisó:	Lorena Correa Restrepo	Coordinadora operativa		2025-10-13
Aprobó:	-Jonatan Zárate Álvarez	Director técnico		2025-10-13
Localización del documento:		Plataforma SGC		

Control de Cambios

Estado	Fecha Inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2020/10/29	1	Ninguno (versión original).	YLCR	DPP	YELP
Obsoleto	2021-10-30	2	Se incluyen pruebas a realizar para confirmación de resultados positivos	YLCR	DPP	YELP
Obsoleto	2022-11-05	3	Se modifica el tiempo de exposición de las placas inoculadas con la cepa <i>Aspergillus brasiliensis</i> , indicado en el numeral 2.2 y el tiempo requerido en la desinfección de la cabina en el numeral 4.1.3	YMRM	APPP	DPP
Obsoleto	2023-06-05	4	Se modifica la referencia bibliográfica de los documentos normativos	YMRM	APPP	DPP
Vigente	2025-10-13	5	Se incorporan los pasos para el análisis y reporte de resultados de superficies muestreadas con esponjas rehidratadas en los	YMRM	APPP	DPP


	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

			numerales 4.6.5 y 4.7 del procedimiento. Se modifican las condiciones ambientales del área de ensayo.			


	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Contenido

1.	OBJETIVO Y ALCANCE.....	6
1.1	OBJETIVO:	6
1.2	Alcance	6
2.	DEFINICIONES Y NOTACIONES.....	6
2.1	Definiciones.....	6
2.2	Notaciones.....	7
3.	REFERENCIAS	8
4.	DESARROLLO.....	9
4.1	Actividades previas.....	9
4.1.1	Inspección de la muestra.....	9
4.1.1	Estabilización.....	9
4.1.2	Verificación de equipos y áreas de ensayo.....	10
4.1.3	Manejo de la muestra	10
4.1.4	Almacenamiento y vida útil del kit de ensayo de salmonella	10
4.1.5	Medidas de seguridad.....	11
4.2	Patrones y equipos de medición.....	11
4.3	Materiales y consumibles.....	12
4.4	Reactivos y/o soluciones:.....	12
4.5	Controles requeridos:.....	12
4.6	Instrucciones de ensayo.....	13
4.6.1	Preparación de soluciones.....	13
4.6.2	Preparación de Solución de cloro 1-5 %	13
4.6.3	Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo	14
4.6.4	Para muestras de cannabis	15
4.6.5	Muestras ambientales.....	15
4.6.6	Proceso de lisis y amplificación:	18
4.6.7	Apéndice: Interrupción por protocolo:	20
4.6.8	Descarte de puntas y reactivos usados en el proceso	20
4.6.9	Confirmación de muestras con resultado positivo.....	21
4.6.10	Identificación bioquímica usando kit comercial:.....	22
4.7	INFORME.....	23
4.8	Aseguramiento de la calidad	23
5.	RESPONSABILIDADES.....	24

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

5.1	Director de Técnico.....	24
5.2	Director de Calidad.....	24
5.3	Líder de Laboratorio.....	24
5.4	Analista.....	24
6.	FORMATOS RELACIONADOS.....	25
7.	ANEXOS.....	25

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

1. OBJETIVO Y ALCANCE

1.1 OBJETIVO:

Determinar la presencia de *Salmonella spp* mediante ampliación isotérmica de ADN (Detección molecular)

1.2 Alcance

Prueba o ensayo	Norma o método de referencia	Técnica o Método
Determinar la presencia/ausencia de <i>salmonella spp</i>	AOAC 2016.01 (2023)[5]	Amplificación isotérmica de DNA (Detección molecular)

Este método se aplica para alimentos para consumo humano y cannabis


2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones

***Salmonella spp.*[4]:** es un bacilo Gramnegativo 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 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*.

Su temperatura optima de crecimiento es de unos 37°C y la a_w 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.

Molecular Detection System (MDS): El Sistema 3M™ de Detección Molecular, basado en una innovadora combinación de tecnologías, la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (ADN) y detección por bioluminiscencia, para proporcionar una solución rápida, precisa y fácil de usar.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

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.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

3. REFERENCIAS

- [1] Instituto Colombiano de Normas Técnicas (2023). Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos (Norma Técnica Colombiana NTC 4092:2009).
- [2] Centro Español de Metrología Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados. 3ª edición en español
- [3] Instituto Colombiano de Normas Técnicas (2023). Microbiología. método horizontal para la detección de Salmonella en alimentos. (Norma Técnica Colombiana NTC 4574:2007)
- [4] International Organization for Standardization. (2023). Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp. (International Standard. ISO 6579-1:2017).
- [5] Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2023) 22nd Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 2016.01.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

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 50 gramos de muestra para realizar este análisis, para el caso de cannabis puede ser de 5 a 10 g en el caso de material vegetal y de 1 a 2 gramos para cristales y extractos.

En caso de que la muestra no presente alguna de estas condiciones, informar de inmediato al líder comercial a través del Líder de laboratorio.

4.1.1 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 o colocarlas entre 15 y 20 minutos en la incubadora a 37 °C.

Para los kits de ensayo se debe realizar la estabilización térmica de acuerdo con las siguientes instrucciones:

4. De 20 a 25 °C de 16 a 18 horas (Mínimo 2 horas)
5. Colocarlos dentro de la incubadora a 37 °C por una hora
6. Colocarlos dentro del bloque de calentamiento a 100 °C por 30 segundos

Se deben invertir los tubos durante 3 veces para lograr hidratación de las paredes y re suspender todos los ingredientes de los reactivos de lisis

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

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	15,00	25,00	Condiciones establecidas por el laboratorio
Humedad relativa	30,00	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.

4.1.2 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 PROC-TC-026 y PROC-TC-027.


4.1.3 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 homogenizada a excepción de las muestras que requieran almacenarse en refrigeración.

4.1.4 Almacenamiento y vida útil del kit de ensayo de salmonella

Almacene los kits ensayo de detección Molecular 2 para Salmonella 3M® entre 2 C y 8 C. No lo congele. Durante el almacenamiento, mantenga el kit fuera del alcance de la luz. Después de abrir el kit, verifique que la bolsa de aluminio no esté dañada. Si la bolsa está dañada, no use el producto. Después de abrir el embalaje, los tubos de reactivo no utilizados se deberán guardar siempre en la bolsa resellable junto con el desecante para conservar la estabilidad de los reactivos liofilizados. Almacene las bolsas cerradas a una temperatura entre 2 C y 8 C durante 60 días como máximo o verificar si después de este tiempo los reactivos todavía se encuentren en las condiciones adecuadas. No utilice el Ensayo de Detección Molecular 2 para Salmonella 3M® después de su fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote están impresos en la etiqueta externa de la caja. Después de usarlos, el medio de enriquecimiento y los tubos del Ensayo de Detección

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Molecular 2 para Salmonella 3M[®] podrían contener materiales patógenos. Una vez terminada la prueba, proceda de acuerdo con los estándares actuales de la industria para el desecho de residuos contaminados. Consulte la Hoja de Datos de Seguridad para obtener más información y conocer las normativas locales para el desecho de materiales.

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 del equipo se encuentre vigente (ubicados en el módulo 1 del laboratorio) 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 garantizar 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.


Durante el análisis tener en cuenta que se debe seguir el procedimiento aquí descrito sin modificar ningún parámetro.

Tener en cuenta las instrucciones dadas en el reglamento interno de trabajo PROC-GC- 015 Reglamento Interno AOXLAB S.A.S, capítulo XIII.

4.2 Patrones y equipos de medición.

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

- Balanza gramera con resolución de 0.01 g
- Vortex
- Transfer pipeta de 1000 µl
- Pipeta multicanal 20-50 µl
- Transfer pipeta de 100 µl
- Baño de agua a 41.5 °C
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora a 37° ± 1°C
- Equipo MDS
- Bloque de calentamiento 100 °C ± 1 °C
- Bloque de enfriamiento (temperatura ambiente 18-25 °C)
- Homogenizador de muestras (Stomacher)
- Dilucult (Equipo de pesaje y dilución de muestras)
- Nevera almacenamiento de medios
- Computador
- Termómetro de inmersión parcial 100 °C ± 1 °C
- Cronometro

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4.3 Materiales y consumibles

- Puntas para transfer pipeta de 1000 µL
- Puntas con filtro para transfer pipeta de 100 µL
- Bolsas whirl pak estériles
- Clic de ajuste para bolsas stomacher
- Gradillas
- Cajas de Petri plásticas estériles de 90 a 100 mm
- Asa y/o rastrillo microbiológico
- Probeta de 250 ml
- Herramientas encapuchado/desencapuchado
- Guantes de látex sin talco
- Aspersor


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

4.4 Reactivos y/o soluciones:

- Agua peptonada tamponada doble concentración
- Agua peptonada tamponada
- Caldo digerido de caseína de soja (CASO)
- Agar Xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- Agar hektoen
- Caldo Rappaport Vassidialis (RVS)
- Leche descremada UHT o en caso de que no se tenga se puede preparar pesando 100 g de leche en polvo descremada en un litro de agua destilada
- Kit de detección molecular de salmonella 2
- Solución de Hipoclorito de sodio 1-5 %
- Reactivo kovac's
- Tirilla oxidasa bactident
- Peróxido de hidrogeno
- Kit API 20 E para identificación bioquímica
- BBL crystal para enterobacterias

4.5 Controles requeridos:

- **Control negativo (CN):** se usa para evaluar contaminación de los reactivos. Se debe realizar con agua peptonada tamponada, nunca usar agua sola. Mezcla de detección y amplificación específica, no contiene ADN molde.
- **Control de reactivos (RC):** se usa para garantizar que el kit funciona correctamente, es una mezcla de detección y amplificación específica de un fragmento de ADN molde que se amplifica durante la reacción. No es ADN del patógeno.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

- **Control de matriz (MC):** Se usa para verificar si existe o no inhibición de la reacción, se realiza cada vez que se vaya a correr una matriz nueva.

4.6 Instrucciones de ensayo.

4.6.1 Preparación de soluciones


Solución	Cantidad reactivo	Cantidad diluyente (Agua destilada)	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.
Caldo Rappaport Vassidialis	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar en tubos de 10 ml
Caldo digerido caseína de soja	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar en frasco 1000 ml por cada muestra.
Agua Peptonada tamponada estéril	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar en frasco 1000 ml por cada muestra.
Agua Peptonada tamponada doble concentración estéril	Usar dos veces la cantidad en las especificaciones de casa comercial para 1 litro de agua	Según especificaciones de casa comercial	Preparar en frasco 1000 ml por cada muestra.
Caldo Lethen	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar tubos de 10 20 mL.

El registro de la preparación de estas soluciones se diligencia en el FOR-TC 045

4.6.2 Preparación de Solución de cloro 1-5 %

se prepara de acuerdo con la siguiente fórmula

$$V = \frac{Cd \times Vd}{Cc}$$

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Donde:

Cd= concentración deseada

Vd= volumen deseado

Cc= concentración conocida

$$V = \frac{3 \% \times 500 \text{ mL}}{15 \%}$$

$$V = 100 \text{ mL}$$

$$500 \text{ mL} - 100 \text{ mL} = 400 \text{ mL agua}$$

Solución de hipoclorito al 3% = 400 mL agua + 100 mL de cloro al 15%


NOTA: la solución de hipoclorito se debe preparar cada vez que se realice el proceso de detección molecular, se almacena máximo por 24 horas

- **Control positivo:** Suspensión bacteriana de *Salmonella* ATCC 14028 de aproximadamente 20- 80 UFC
- **Control negativo:** Suspensión bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922 de aproximadamente 20-80 UFC

Preparadas según "procedimiento para la preparación de suspensiones microbianas" PROCT-TC-207

4.6.3 Pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo

7. Permita que el medio de enriquecimiento (BPW ISO) alcance un equilibrio en la temperatura ambiente del laboratorio o a $41,5^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ según la matriz analizada. Consulte las Tablas 2 o 3
8. Para el pesaje y dilución de muestras se puede realizar usando la balanza o el dilucult (ver PROC-TC-199)
9. Pesar asépticamente (prendiendo un mechero al lado de la balanza) en una bolsa whirl pak 25 ± 5 % gramos o mililitros del producto a analizar, añadir 225 ml de agua peptonada tamponada para obtener una solución 1:10. Llevar al stomacher por 1 minuto e incubar a $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 18 a 24 horas. Reportar los pesos en el FOR-TC-075 "Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos".
10. Para todas las muestras con alto contenido de partículas y carne, se recomienda utilizar bolsas con filtro.
11. Para matrices que aumentan de tamaño en agua y son altamente viscosas (p. ej.: cereales o almidón), se sugiere hacer diluciones adicionales (>1:10) hasta que la viscosidad se reduzca adecuadamente o agregar alfa-amilasa estéril al 1 % (p/v) al medio de enriquecimiento (BPW ISO)

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

12. Para muestras grandes de leche en polvo y cereales, agregue la muestra al líquido lentamente y mezcle con frecuencia para evitar grumos.

13. Incube como se indica en la tabla del protocolo correspondiente (consulte las tablas 2, 3) además revisar PROC-TC-199

4.6.4 Para muestras de cannabis

Material vegetal: Pesar 10 g de muestra para el caso de material vegetal y se adicionan 235mL de agua Tamponada a doble concentración y 240 mL de leche descremada UHT o en caso de que no se tenga se puede preparar pesando 100 g de leche en polvo descremada en un litro de agua destilada y se lleva a esterilización en autoclave.

En caso de que no se cuente con la muestra suficiente se pesan 5 g de muestra y se adicionan 117.5 mL de agua peptona a doble concentración y 120 mL de leche descremada (Metodología basada en protocolo 5 dado por proveedor de equipo)

Este procedimiento también se puede realizar pesando 10 g de muestra y se adicionan 90 mL de caldo digerido de caseína de soja

Cristales y extractos oleosos: Pesar 1 a 2 g y se adicionan 9 mL de caldo digerido de caseína de soja por cada gramo pesado conservando la dilución 1:10

4.6.5 Muestras ambientales

Los dispositivos de recolección de muestras pueden ser esponjas hidratadas con una solución neutralizante para desactivar los efectos de los desinfectantes. 3M recomienda el uso de una esponja de celulosa libre de biocidas. La solución neutralizante puede ser el caldo neutralizante Dey-Engley (D/E) o el caldo Lethen con un volumen de 10 a 20 mL. La etapa de enriquecimiento se lleva a cabo adicionando 100 mL de caldo tampona y se incuba a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ de 18 a 24 horas.

Si se usan tubos con hisopos, se transfiere el contenido y la punta del hisopo a una bolsa Whirl-Pak® con 100 mL de caldo tampona, siguiendo la misma incubación. Se recomienda desinfectar el área después de la toma.


	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Tabla 2. Protocolos generales de enriquecimiento.

Matriz de muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)	Volumen de análisis de la muestra (μL) ^(a)
Protocolo 1 Productos alimentarios procesados (con excepción de polvos de huevo y otros productos especificados en otros protocolos) ^(b)	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-26	20
Protocolo 2 Alimentos crudos y no procesados, polvos de huevo, alimentos para animales y muestras ambientales ^(c)	25 g	225 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-26	20
Protocolo 3 Productos lácteos en polvo (incluida la leche maternizada instantánea y la leche maternizada a base de soya)	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20-26	20
Protocolo 4 Productos a base de cacao (cacao en polvo, chocolates, productos de confitería, etc.)	25 g	225 mL de leche descremada en polvo estéril (100 g/L) con 0,002% de tintura verde brillante ^(d,e,f)	37	24-30	20
Protocolo 5 Otros incluyen: especias, hierbas aromáticas, concentrados, té y cafés instantáneos, spices, aromatic herbs, concentrates, instant teas and coffees, cubos de caldo	25 g	235 mL 2X BPW ISO con 0,5% K ₂ SO ₃ + 240 mL de leche descremada en polvo estéril (100 g/L) ^(d,g,h)	37	24-30	10

Protocolo 6 Nueces o mezclas de frutos secos con nueces (este protocolo es apropiado para otros frutos secos tales como nueces pecanas, almendras, pistachos, castañas de cajú y castañas)	25 g	225 mL de leche descremada en polvo estéril (100 g/L) ^(d)	37	18-24	20
--	------	--	----	-------	----

- (a) Volumen de muestra transferido a los tubos de Solución de Lisis. Consulte el paso 4.7 de la sección Lisis.
- (b) Ejemplos de productos que se deben analizar con el Protocolo 1: comidas listas para usar, ensaladas delicatessen, natilla.
- (c) Ejemplos de productos que se deben analizar con el Protocolo 2: carnes crudas, vegetales congelados, leche fermentada, salada cruda (lechuga, Batavia).
- (d) La leche descremada UHT puede substituirse por leche descremada en polvo.
- (e) 0,45 mL de 1% de solución colorante acuosa verde brillante por 225 mL de leche descremada, lo que dará como resultado una concentración final de 0,002% (0,02 g/L) de solución colorante verde brillante.
- (f) Para preparar leche descremada en polvo estéril, suspenda 100 g de leche descremada en polvo deshidratada en 1 L de agua destilada o purificada. Agitar hasta que se disuelva. Autoclave por 15 minutos a 121 °C. Almacene a 2 °C y 30 °C⁽⁸⁾.
- (g) 5 g de K₂SO₃ por 1000 mL BPW ISO, lo que dará como resultado una concentración final de 0,5% K₂SO₃.
- (h) Deberá añadirse 240 mL 100 g/L de leche descremada en polvo estéril a 235 mL 2X BPW ISO esterilizado con 0,5% K₂SO₃.

Si se usa un paso de enriquecimiento secundario opcional, por ejemplo Rappaport Vassiliadis Medium, se requiere realizar una disolución de 1:2 (1 parte de enriquecimiento en 1 parte de caldo de enriquecimiento estéril) o simplemente transferir 10 μL del enriquecimiento secundario a los tubos de Solución Lysis 3M. Si se utiliza Caldo de Tetrionato (TT), transfiera 20 μL del enriquecimiento secundario a los tubos de Solución Lysis 3M, y no utilice un agitador eléctrico para enriquecimiento TT ni utilice una pipeta desde el fondo del tubo de enriquecimiento para evitar transferir algún precipitado.



	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Tabla 3. Protocolos de enriquecimiento de acuerdo con el certificado #091501 de AOAC OMASM 2016.01 y AOAC PTMSM. El volumen de muestra transferido a los tubos de Solución de Lisis 3M es de 20 µL.

Matriz de muestra	Tamaño de la muestra	Volumen del caldo de enriquecimiento	Temperatura de enriquecimiento (± 1 °C)	Tiempo de enriquecimiento (horas)
Carne molida cruda	25 g	225 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	10-24
	325 g	975 mL de BPW ISO (precalentada)		
Carne de ave molida cruda	25 g	225 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	10-24
	325 g	975 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	14-24
Carne de ave cocida congelada	325 g	2925 mL de BPW ISO	37	18-24

Alimento para perros seco	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	
	375 g	1500 mL de BPW ISO			
Pimienta negra, camarón entero crudo, espinaca cruda empaquetada, queso americano procesado pasteurizado	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	
Enjuague de carcasa de ave	30 mL	30 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24	
Esponja de carcasa de ave	1 esponja	50 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24	
Leche descremada en polvo instantánea	25 g	225 mL de BPW ISO	37	20-24	
Cacao en polvo	25 g	225 mL de BPW ISO	37	24-28	
Huevo entero líquido pasteurizado	100 mL	900 mL de BPW ISO	37	18-24	
Agua de irrigación de brotes	375 mL	3375 mL de BPW ISO	37	18-24	
Mantequilla de maní cremosa	25 g	225 mL de BPW ISO	37	18-24	
	375 g	3375 mL de BPW ISO			
Ambiental	Hormigón sellado	1 esponja	225 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24
	Acero inoxidable	1 hisopo	10 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24
	Mosaico de cerámica sellado	1 esponja	50 mL de BPW ISO (precalentada)	41,5	18-24

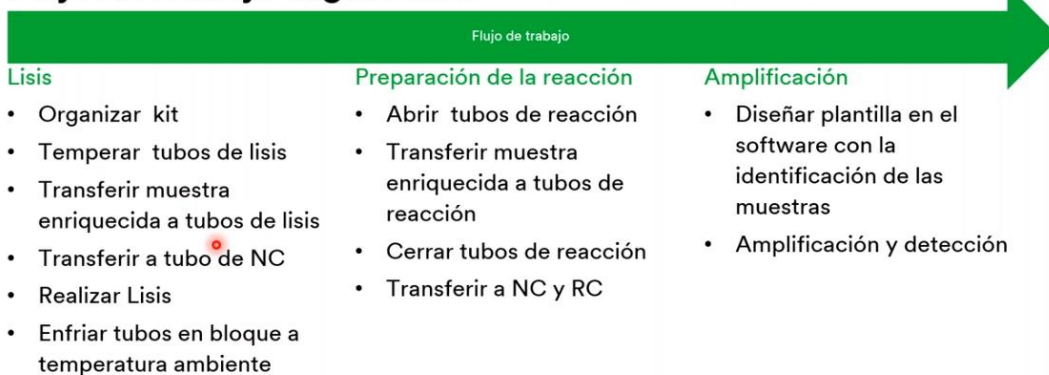
	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4.6.6 Proceso de lisis y amplificación:

4.6.6.1 Organización de flujo de trabajo:

Después del tiempo de preenriquecimiento de acuerdo con el numeral 5.2, organizar el flujo de trabajo para el proceso de amplificación de ADN

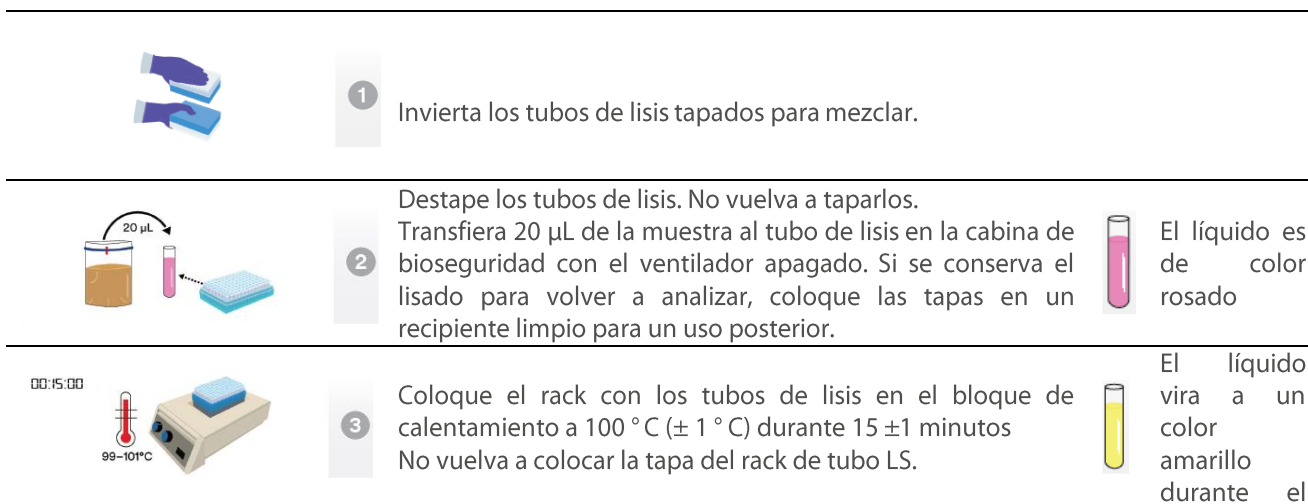
Flujo de trabajo organizado




4.6.6.2 Pasos durante el proceso de lisis y amplificación de ADN

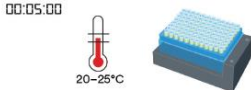

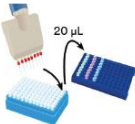



En cada una de las corridas se debe tener un tubo de lisis y un tubo de reacción para cada muestra, además de un tubo de lisis para el control de reactivo y el control negativo y un tubo de control de reactivo.

Se debe asegurar que las perlas de los tubos de reacción se encuentren en el fondo y no se encuentren rotas o dañadas. Se debe usar una punta con filtro para cada muestra. Durante esta etapa se debe apagar los aires acondicionado o flujos de aires directo en el área para evitar contaminación cruzada por circulación de ADN.









	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

calentamiento

	4 Coloque el rack con los tubos de lisis sin tapa en el bloque de enfriamiento a temperatura ambiente (20-25 ° C) durante 5 minutos máximo 10 minutos No congele el bloque de enfriamiento ni use la bandeja	 El líquido vuelve a ser de color rosado
	5 Transfiera 20 µL del lisado al tubo de reactivo en la cabina de bioseguridad con el ventilador apagado. Si son muchas muestras, usar la pipeta multicanal. Pipetee hacia arriba y hacia abajo 5 veces para mezclar. Se debe destapar una sola fila a la vez y el control de reactivo se adiciona cuando ya se tengan todos los tubos de reactivo tapados	
	6 Transfiera los tubos cerrados a la bandeja de carga rápida.	
	7 Comience la corrida usando el software. Coloque la bandeja de carga rápida en el equipo y cierre la tapa.	
	8 Los resultados presuntivos positivos pueden aparecer a partir de los 15 minutos. Resultados negativos a los 60 minutos. Si conservara el lisado para reexaminar, lávese las manos, vuelva a ponerse guantes y tape los tubos de lisis. Almacénelos de 4 a 8°C.	

Una vez finalizada la corrida verificar que los iconos que aparecen no presenten ninguna falla de acuerdo con la siguiente tabla. Si alguna muestra queda con algún error se debe revisar el proceso y volver a analizar estas muestras. Si por algún motivo se requiere cancelar el proceso se debe tener en cuenta lo mencionado en el Apéndice mencionado en el numeral 5.3.3

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

Tipo de Pocillo	Símbolo del resultado del pocillo	Resultado	Interpretación
Muestra		Positivo	Se presume que la muestra dio positivo para el patógeno estudiado.
Muestra		Negativo	Se presume que la muestra dio negativo para el patógeno estudiado.
Muestra		Inhibido	La matriz de muestra fue inhibitoria al ensay. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.
Muestra		Inspeccionar	Es indeterminada la presencia o ausencia del patógeno estudiado. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.
Muestra		Error	No se detectó bioluminiscencia. Puede que se requiera un nuevo estudio. Consulte la sección de solución de problemas y las Instrucciones del Producto del kit de ensayos para obtener más información.


4.6.7 Apéndice: Interrupción por protocolo:

Almacenamiento y repetición de pruebas de lisados tratados con calor

1. Para almacenar un lisado tratado con calor, vuelva a tapan el tubo de lisis con una tapa limpia (consulte Lisis, sección 4.5).
2. Almacene entre 4 °C y 8 °C por hasta 72 horas.
3. Prepare una muestra almacenada para amplificación invirtiéndola 2 a 3 veces para mezclar.
4. Destape los tubos.
5. Coloque los tubos de lisados mezclados en el Bloque de Calor para el Sistema de Detección Molecular 3M y caliéntelos a 100 °C ± 1 °C durante 5 ± 1 minutos.
6. Retire la gradilla de tubos Solución de Lisis 3M del bloque de calentamiento y deje que se enfríe en la Inserción del Bloque de Frío para el Sistema de Detección Molecular 3M al menos durante 5 minutos y por un máximo de 10 minutos.
7. Siga el protocolo en la sección Amplificación que se detalla arriba.

4.6.8 Descarte de puntas y reactivos usados en el proceso

Las puntas y reactivos de lisis y amplificación usadas en el proceso se deben descartar en un recipiente que contenga solución de hipoclorito de sodio del 1 al 5 % preparada de acuerdo con el numeral 5.2 durante 1 a 2 horas. Pasado este tiempo se descartan en caneca roja.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4.6.9 Confirmación de muestras con resultado positivo

Para los resultados positivos obtenidos en la amplificación de ADN se debe realizar una confirmación mediante técnicas tradicionales y se debe usar el pre-enriquecimiento inicial usado para la detección en el equipo, este pre-enriquecimiento se puede guardar máximo 72 h entre 4° C - 8 °C. Seguir los siguientes pasos para la confirmación:

4.6.9.1 Enriquecimiento en medios líquidos selectivos:

Tomar 0.1 ml del caldo de pre-enriquecimiento no selectivo y llevar a un tubo que contiene 10 ml de Caldo Rappaport Vassiliadis. Incubar a 41. 5° ± 1°C durante 24 horas ± 3 h. En esta etapa de enriquecimiento selectivo, se estimula y favorece el crecimiento de Salmonella y se restringe la proliferación de la flora competitiva

4.6.9.2 Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos:

A partir de los cultivos obtenidos en los medios líquidos selectivos, sembrar en superficie con asa por agotamiento en mínimo 2 medios selectivos:

- Agar Xilosa- Lisina- Desoxicolato (XLD).
- Agar Hecktoen (HE).

Invertir las cajas sembradas e incubar a 37°C ± 1°C. Durante 24 ± 3 horas.

DIFERENCIACIÓN DE LAS U.F.C. TÍPICAS DE Salmonella


MEDIO CULTIVO	DE	CARACTERÍSTICAS U.F.C. TÍPICAS
AGAR HEKTOEN		Verdes azulados con o sin centro negro por producción de H ₂ S
AGAR XLD		Del mismo color que el medio de cultivo, transparentes; a veces con centro negro (H ₂ S). Salmonella lactosa positivas: amarillas con o sin ennegrecimiento Salmonella H ₂ S negativas: rosas con un centro rosa más oscuro

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

4.6.9.3 Confirmación de colonias presuntivas aisladas.

Las colonias sospechosas de Salmonella se deben aislar tomando al menos una colonia sospechosa o típica del medio de cultivo selectivo y se siembran en superficie en agar tripticasa soya o PCA, se incuban a 37°C ± 1°C durante 24 h ± 3 h

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.

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

4.6.9.4 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.

4.6.9.5 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 púrpura y si es negativa la coloración es amarilla. Salmonella es oxidasa negativa

4.6.9.6 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 es catalasa positiva.

4.6.9.7 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.


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)

4.6.10 Identificación bioquímica usando kit comercial:

La confirmación con este kit se realizará solo en casos donde no se obtengan colonias típicas de crecimiento en los agares selectivos ya que puede presentarse casos de crecimiento atípico de las

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13


colonias de *Salmonella spp.* También se usará este kit cada que se obtengan 5 resultados positivos para este microorganismo a una de las muestras con este resultado.

4.7 INFORME

Después de realizar las pruebas confirmativas de Salmonella se reportará como Ausencia o Presencia de *Salmonella spp.*, en el FOR-TC-075 "formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos". Para muestras ambientales tomadas con esponjas, en las que se evidencie la toma en un área de 100 cm², el resultado se reportará como 'Presencia' o 'Ausencia' por cada 100 cm².

4.8 Aseguramiento de la calidad

Para asegurar y controlar la validez de los resultados, por cada lote de análisis, se debe ensayar por cada matriz una muestra por duplicado. Así mismo, en cada lote de ensayo, se debe realizar control de esterilidad de las placas de los medios de cultivo poniendo a incubar una placa sin inocular, realizar un blanco adicionando 1 ml de diluyente, realizar un control positivo con Suspensión de *Salmonella* ATCC 14028 y un control negativo usando suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922

	Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i> AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

5. RESPONSABILIDADES.

5.1 Director de 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.

5.2 Director de Calidad.


- 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.

5.3 Líder de microbiología

- 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.

5.4 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.

	<p align="center">Procedimiento para la detección molecular de <i>salmonella spp.</i></p> <p align="center">AOXLAB S.A. S</p>	Identificación: PROC-TC-165
		Revisión: 5
		Inicio de vigencia: 2025-10-13

- 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.

6. FORMATOS RELACIONADOS.

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

SOFT-TC-027 "Cuadro de mando para ensayos microbiológicos por recuento"

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

7. ANEXOS.

No Aplica.