



## MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINACIÓN DE *Salmonella* sp. EN AGUAS SUPERFICIALES Y LAVADO DE FRUTA, SM 9260 B, 2d.

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá

Código: D-7.2-04

Versión: 05

Revisor: Subdirector de Planeación y O.T.

Aprobó: Director General (E).

Fecha: 09 de Julio de 2025

Fecha: 09 de Julio de 2025

Resolución: 100-03-10-23-1338-2025

Páginas: 1 de 7

### 1. DESCRIPCIÓN

*Salmonella* sp. es un género de bacteria que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, formado por bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, con flagelos perítricos y que no desarrollan cápsula (excepto la especie *S. typhimurium*), aunque fundamentalmente las Salmonellas son bacterias intestinales, se encuentran distribuidas en el ambiente y con frecuencia en vertido de granjas, aguas residuales humanas y en cualquier material con contaminación fecal. El consumo de este microorganismo en agua genera una enfermedad infecciosa en hombres y animales conocida como salmonelosis que puede llegar a una fiebre tifoidea, por *Salmonella* entérica serovariedad Typhi, la cual es una enfermedad sistémica cuyo cuadro clínico varía desde una infección subclínica o leve hasta un cuadro grave con complicaciones y cuya tasa de enfermedad para *S. Typhi* en las Américas es de 10 por 100.000 habitantes (2-32; IC de 95%) y la mortalidad de 0,07 (0,01-0,2; IC de 95%) por 100.000 habitantes

### 2. ALCANCE

Este método es aplicable para la determinación de *Salmonella* sp. En: agua superficial, marina y alimentos, de acuerdo a lo especificado en la experimentación base de la validación de la metodología.

### 3. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

#### 3.1 Principio

El método consiste en la detección de *Salmonella* en agua por medio de la filtración de la misma a través de una membrana de celulosa de tamaño de poro de 0,45 µm de diámetro, la cual permite la retención de microorganismos y el cultivo de estos. El filtro es sumergido en agua peptonada, con el fin de la revivificación de células de *salmonella* lesionadas, incrementando su vitalidad y brindando las condiciones adecuadas para su perfecto desarrollo, posteriormente se toma una alícuota y se pasa al Caldo Tetratrationato para incrementar la población de *salmonella* e inhibir la proliferación de otros microorganismos presentes en la muestra; el aislamiento se realiza en el agar selectivo y diferenciador xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar selectivo para bacilos entéricos que restringen el crecimiento de otros géneros y permiten el reconocimiento visual de colonias sospechosas. Posterior a ello, se hace identificación bioquímica de las colonias sospechosas con el fin de descartar falsos positivos.

#### 2.3 Interferencias

La interferencia para esta prueba se da por la alta concentración de

microorganismos coliformes totales y fecales presentes en la muestra de agua, que se ven aumentados al ser preenriquecidos en agua peptonada, limitando la recuperación de las *Salmonellas* sp lesionadas, y limitando a su vez la inhibición de las bacterias coliformes en tetratrationato.

Las concentraciones de *Salmonella* sp, en muestras de agua superficial o de lavado de fruta suelen ser escasa, lo que limita la recuperación del microorganismo.

#### **4. TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO**

El volumen mínimo de muestra requerido para este análisis es de 1 L. La muestra es tomada en un frasco tapa roscas Schott de 1 L de capacidad, estéril, teniendo en cuenta que el llenado de la muestra debe ser dos terceras partes de la capacidad del recipiente. Al llegar al laboratorio la muestra debe ser procesada inmediatamente debido a las condiciones estrictas del desarrollo del microorganismo y a que las poblaciones de *Salmonella* sp en muestras de agua suelen ser escasas. La conservación de la muestra se hace guardándose en nevera a temperatura menor a 10°C.

#### **5. INSTRUMENTAL Y EQUIPOS**

- Base Manifold para filtración.
- Bomba de vacío.
- Papel kraft.
- Autoclave.
- Membranas de 0,45 micras estériles.
- Pinzas estériles.
- Incubadora.
- Mechero.
- Pipetas volumétricas de 10mL.
- Horno de esterilización.
- Tubos de ensayo.
- Microscopio.

#### **6. REACTIVOS**

- Agua peptonada.
- Caldo tetratrationato base.
- Agar Hektoen.
- Tierra de Diatomeas.
- Agar XLD.
- Serie bioquímica para para microorganismos entéricos (TSI, LIA, urea, citrato Simons, SIM, VP y MR caldo).

Corporación para el Desarrollo Sostenible del Urabá		
D-7.2-04	Versión: 05	Página: 2 de 7

- Coloración de Gram.

## 7. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

**Agua Peptonada:** Caldo para el crecimiento previo no selectivo de bacterias, especialmente de Enterobacteriaceas patógenas a partir de alimentos y otros materiales. Preparación: Disolver 25g/L, distribuir eventualmente en tubos y esterilizar en autoclave (15 min a 121°C). pH 7,2±0,1.

**Agar Hektoen:** Disolver 75 g en 1 litro de agua desmineralizada, llevar a ebullición durante unos pocos segundos para disolver el medio completamente, cerciorarse de que se tenga pH: 7,7 ± 0,2 a 25 °C, No Autoclavar y finalmente verter en cajas Petri.

**Caldo Tetrationato:** Disolver 46 g en un L de agua desmineralizada, calentar brevemente hasta la ebullición (No autoclavar).

**Agar XLD:** Agar empleado para el aislamiento y diferenciación de Enterobacteriaceas patógenas, especialmente de especies de *Shigella* y *Salmonella*. Preparación: Disolver 55 g/L, ajustar el pH a 7,4 y verter en cajas de Petri, NO AUTOCLAVAR.

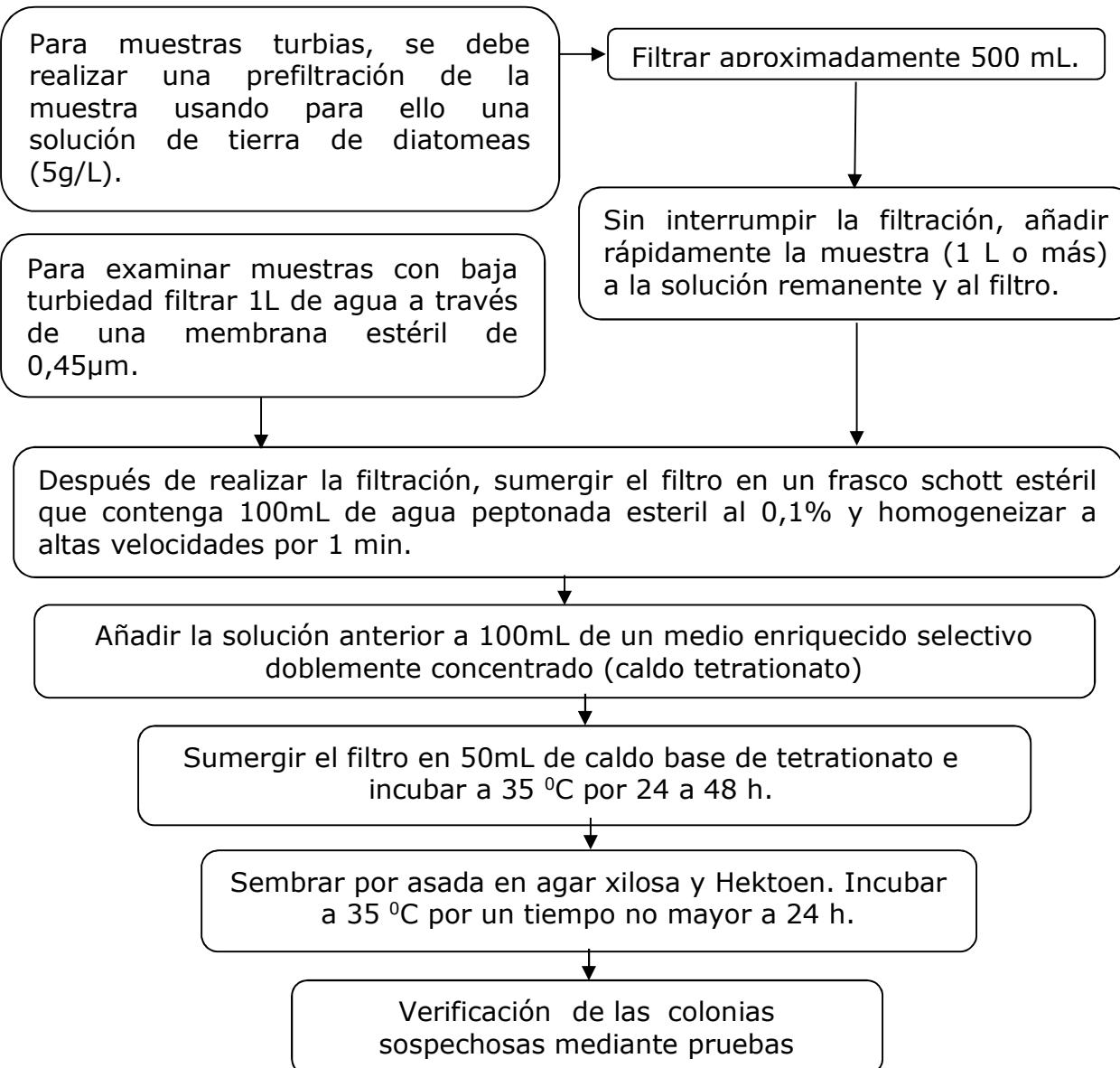
## 8. PROCEDIMIENTO

- Para examinar muestras con baja turbiedad se recomienda filtrar 1 L de agua a través de una membrana estéril de 0,45 micras.
- Para muestras turbias, se debe realizar una prefiltración de la muestra en una solución de tierra de diatomeas (5 g/L) y filtrar aproximadamente 500 mL. Sin interrumpir la filtración, añadir rápidamente la muestra (1 L o más) a la solución remanente y al filtro.
- Despues de realizar la filtración, sumergir el filtro en un frasco schott estéril que contenga 100mL de agua peptonada esteril al 0,1% y homogeneizar a altas velocidades por 1 min. Añadir la solución anterior a 100mL de caldo tegrationato doble concentrado, el cual constituye un medio Enriquecido selectivo.
- Posteriormente, realizar el filtrado de la solución anterior en filtro de 47 mm de diámetro y de 1,5 µm de poro para retener la tierra de diatomeas.
- Tomar el filtrado y pasarlo por una membrana de celulosa de 0,45um de diámetro de poro para favorecer la retención del microorganismo blanco de estudio.
- Sumergir el filtro en 50mL de caldo base de tegrationato para incrementar las poblaciones de *Salmonella* sp. e inhibir otros microorganismos, e incubar a 35 °C por 24 a 48 h.
- Sembrar por asada en agar XLD y Hektoen e incubar a 35 °C por un tiempo no mayor a 24 h.
- Las colonias típicas de salmonella en agar XLD son rojas con el centro negro debido a la producción de H<sub>2</sub>S. Mientras que, las colonias típicas de salmonella

en agar Hektoen son verde azul con o sin centro negro sin precipitado.

- Verificar las colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas.

## 9. ALGORITMOS



## 10. CÁLCULOS Y RESULTADOS

Las colonias son reportadas como presentes o ausentes.

## 11. SEGUIMIENTO Y CONTROL DE CALIDAD

Para cada lote de medio preparado, realizar:

**Control Negativo:** Durante el análisis de agua y con el fin de descartar cualquier contaminación externa, se realiza un control negativo que garantice una correcta esterilidad en el proceso de preparación y montaje del método. En el caso de los caldos nutritivos, estos serán dejados 24 horas en la incubadora, con el fin de analizar si hay un posible crecimiento de microorganismos antes de su inoculación. En el caso de los medios sólidos estos serán incubados 24 h con el fin de garantizar las condiciones de esterilidad.

**Control Positivo y control especie especificidad:** Con el fin de hacer control de los medios antes de su empleo, se analizará el crecimiento de cepas empleadas para evaluar su calidad. Para el control positivo se empleará *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y para el control de especie especificidad: *Proteus vulgaris* 8427 y *Shigella sonney* ATCC 25931.

## AGAR XLD

**Tabla 1. Morfología macroscópica en agar XLD.**

CEPAS	RESULTADOS DE CRECIMIENTO
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Crecimiento de bueno a excelente, colonias rojas con centro de color Negro.
<i>Proteus vulgaris</i> 8427	Crecimiento parcial o nulo. Colonias de amarillas o naranjas.
<i>Shigella sonney</i> ATCC 25931	Colonias incoloras, sin formación de precipitado.

## AGAR HEKTOEN

**Tabla 2. Morfología macroscópica en agar Hektoen.**

CEPAS	RESULTADOS DE CRECIMIENTO
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Colonias de verde azulado con centro negro sin precipitado.
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC8427	Colonias verde-azulado pueden tener centro negro sin presencia de precipitado.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Colonias rojo salmón, sin precipitado.
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	Colonias verdes, sin formación de precipitado.

Se realiza un duplicado de muestra por día; tomando una muestra al azar.

**Análisis de Efecto matriz:** se realiza mediante el cálculo del porcentaje de recuperación de una muestra de agua añadida con una concentración de 10-100 bacterias/mL de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

$$\%R = (\bar{x} \text{ muestra inoculada}) / (\bar{x} \text{ cepa} + \bar{x} \text{ muestra}) \times 100$$

Donde:

$\%R$  = Porcentaje de recuperación.

$\bar{x}$ = Promedio de la concentración.

El efecto matriz es analizado cada vez que ingresa una matriz diferente de agua superficial.

Todo el control de calidad realizado se registra en el formato “R-7.4-20 captura *Salmonella sp.*” en orden cronológico.

## 12. MANTENIMIENTO

El mantenimiento de las incubadoras se realiza entre 12 a 18 meses de acuerdo a lo evaluado por el laboratorio.

## 13. BIBLIOGRAFÍA

- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. In: Lipps Wc, Braunt-Howland Eb, Baxter Te. Eds. Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater, 24th Ed. Washington Dc: APHA PRESS;2023.
- Diagnóstico microbiológico de KONEMAN. Edición 2008. Editorial médica panamericana (capítulo VI familia Enterobacteraceae).
- FDA, 2004. Food and drug administration: Agencia de Alimentos y Medicamentos o Agencia de Drogas y Alimentos.

## 14. CONTROL DE CAMBIOS

Fecha	Resolución	Versión	Detalle
12/12/2014	300-03-10-23-1864	01	Aprobación inicial con código y nombre D-5.4-04: MÉTODO ANALÍTICO DE DETERMINACIÓN DE SALMONELLA SP. EN AGUAS SUPERFICIALES Y LAVADO DE FRUTA, SM 9260 B.
05/10/2016	300-03-10-23-1303	02	Se actualiza el logo corporativo.

15/08/2018	300-03-10-23-1436	03	<p>De acuerdo al Standard Methods Ed.23 de 2017 se especifican los siguientes cambios:</p> <p>Se especifica de manera precisa el método de análisis en el título del documento, así: SM 9260 B, 2d.</p> <p>En la sección de TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO se cambia la temperatura de almacenamiento de muestra.</p> <p>Se complementa el listado de REACTIVOS usados en el análisis, indicando: Caldo tetratónato base, Agar Hektoen, Tierra de Diatomeas; de igual manera se incorpora la preparación del Caldo tetratónato y del Agar Hektoen en la sección de PREPARACIÓN DE REACTIVOS.</p> <p>Se actualiza la sección de PROCEDIMIENTO teniendo en cuenta el uso de la tierra de diatomeas y el empleo del Agar Hektoen. De igual modo se reestructura el ALGORITMO del método, de acuerdo a las adiciones indicadas en el procedimiento.</p> <p>En la sección de SEGUIMIENTO Y CONTROL se realiza ajuste de los controles negativo y positivo, se adiciona el control del Agar Hektoen y el control de efecto matriz. Además se indica la realización de duplicados por corrida, por día.</p>
19/11/2019	300-03-10-23-1429	04	<p>Se elimina la subsección 3.2 - Definición y se unifica con el criterio de descripción de la sección 1.</p> <p>Por otro lado, se adiciona dentro de la estructura del método la sección 2 – ALCANCE, así: "Este método es aplicable para la determinación de Salmonella sp. En: agua superficial, marina y alimentos, de acuerdo a lo especificado en la experimentación base de la validación de la metodología". También se incluye la sección 12 - MANTENIMIENTO relacionado con el método.</p> <p>Se cambia la codificación del documento pasando de D-5.4-04 a D-7.2-04 de acuerdo a la nueva versión de la Norma – ISO/IEC 17025:2017, así como también se modifica el respectivo formato de captura de datos referenciado en éste.</p>
09/07/2025	100-03-10-23-1338	05	<p>Se actualizó el ítem 13 Bibliografía, edición 24 th de Standard Methods (2023).</p>

**Última línea-----última línea-----última línea**