

	MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	1 de 9

TABLA DE CONTENIDO

1. OBJETIVO	2
2. ALCANCE	2
3. RESPONSABILIDADES.....	2
4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	2
5. CONDICIONES GENERALES	3
6. FUNDAMENTO DEL METODO	3
7. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS.....	4
8. RECOLECCION E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA.....	4
9. CONSERVACION DE LA MUESTRA.....	4
10. EQUIPOS	4
11. REACTIVOS CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA	5
12. DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO	5
13. CONTROL DE CALIDAD DEL ANALITO	5
14. ANALISIS Y EXPRESION DE RESULTADOS	6
15. EMISION DEL INFORME DE RESULTADOS.....	6
16. EXAMENES COMPLEMENTARIOS	6
17. DOCUMEMNTOS DE REFERENCIA.....	7
18. ANEXOS.....	7
18.1 PREPARACION DEL AGAR SELECTIVO PARA <i>Clostridium perfringes</i>	7
18.2 FLUJOGRAMA	8
19. CONTROL DE CAMBIOS.....	9

	MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	2 de 9

1. OBJETIVO

Describir la metodología para realizar el recuento de esporas de bacterias sulfito-reductoras (*Clostridium*); Basados en la norma International ISO 15213:2003, Microbiología de alimentos y alimentos para animales, Método horizontal para el recuento de bacterias sulfito Reductoras que crecen bajo condiciones anaeróbica “Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions”

2. ALCANCE

Este procedimiento aplica para todos los alimentos que por su origen, naturaleza, composición y manipulación pueden ser susceptibles a contaminación por *Clostridium*.

3. RESPONSABILIDADES

Será responsabilidad del profesional asignado, según cronograma de análisis de muestras, verificar que este procedimiento se lleve a cabo según está consignado en este documento.

4. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Esporas: Cuerpo microscópico unicelular o pluricelular que se forma con fines de dispersión y supervivencia por largo tiempo en condiciones adversas.

***Clostridium*:** Bacilo Gram positivo anaerobio, algunos de ellos esporulan y son móviles los principalmente por flagelos periticos.

Clostridium sulfito reductor: Bacilo gran positivo, esporulado que tiene la propiedad de reducir el ión sulfito a Sulfuro en presencia de sales de hierro dando colonias negras.

C.perfringes: *Clostridium perfringes* es el agente etiológico causante de muchas enfermedades y es la tercera causa de toxiinfección alimentaria, dentro de las 5 especies de *Clostridium perfringens* (A, B, C, D, E) el de tipo A es el responsable de la mayoría de procesos infecciosos ya que la enterotoxina que produce se comporta como un súper-

	MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	3 de 9

antígeno que promueve la liberación de mediadores de inflamación.

Agar SPS: (Sulfito Polimixina Sulfadiazina) Para el aislamiento y la enumeración de *Clostridium perfringens* a partir de alimentos y todo tipo de productos alimenticios.

5. CONDICIONES GENERALES

Las especies del género *Clostridium* comúnmente asociadas a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son: *Clostridium botulinum* cuya toxina afecta al sistema nervioso, causando la toxiinfección llamada botulismo y *Clostridium perfringens* cuya enterotoxina afecta al sistema digestivo. La intoxicación por *C. perfringens* es generalmente breve, autolimitada y rara vez es mortal. Sin embargo, las neurotoxinas de *C. botulinum* se encuentran entre los más tóxicos de sustancias que Anaerobios Sulfito Reductores 133 se producen naturalmente y causa graves enfermedades, a veces mortales, con síntomas persistentes durante varios meses. En los alimentos, recuentos elevados de los anaerobios sulfitoreductores pueden indicar la existencia de éstos patógenos. Además, evidencian una posible deficiencia en las buenas prácticas de fabricación a lo largo del proceso de transformación, o materia prima de baja calidad. Debido a las características que poseen los anaerobios sulfitoreductores se suelen usar como indicadores de la calidad higiénica del agua y de los alimentos.

la Preparación de los medios de cultivo requeridos en el procedimiento y el montaje de la muestra se deben realizar con los elementos de protección personal en cuarto de siembra y cabina de bioseguridad.

El acondicionamiento de la muestra y sus diluciones se debe realizar según norma ISO 6887-1, ISO 8261 o cualquier técnica específica apropiada para el producto en cuestión.

6. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO DE ENSAYO

Para la detección y recuento de esporas de *Clostridium* sulfito reductor se utilizan medios de cultivo que contengan sulfito de sodio, sobre el cual los microorganismos reducen el ión sulfito a sulfuro y actúan sobre el citrato férrico para formar sulfuro de hierro. Manifestándose en la aparición de colonias negras.

El agar SPS contiene peptona de caseína que proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El citrato férrico y el sulfito de sodio son

	MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	4 de 9

indicadores de H₂S. *Clostridium perfringens* reduce el sulfito a sulfuro que, a su vez, reacciona con el hierro y forma un precipitado de sulfuro de hierro negro, visto como colonias negras. El sulfato de polimixina B y la sulfadiazina son inhibidores de organismos distintos a *Clostridium* spp.

7. LIMITACIONES O INTERFERENCIAS

Puede ocurrir un difuso e inespecífico ennegrecimiento del medio, especialmente cuando la inoculación se realiza en tubos con agar en lugar de placas de Petri. El crecimiento de bacterias anaerobias, que solo producen hidrógeno y no anhídrido sulfuroso, también puede reducir el sulfito presente y llevar a un ennegrecimiento general del medio.

El agar bacteriológico es el agente solidificante; algunos microorganismos distintos de *C. perfringens* también crecen en agar SPS, por lo que es mejor realizar una tinción de Gram y buscar esporas.

Si se sospecha la presencia de bacterias termófilas, preparar una segunda serie de tubos e incubar a 50°C ± 1°C.

8. RECOLECCION E IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Ver manual de toma y recepción de muestras de alimentos y bebidas alcohólicas laboratorio de salud pública de Santander MI-GS-MA-08, inciso 3: Toma de muestras de alimentos, Tabla 2: Método de recolección de muestras de alimentos y materias primas sólidas, líquidas, deshidratadas y congeladas e inciso 6.2 Entrega de muestras al laboratorio.

9. CONSERVACION DE LA MUESTRA

La muestra se conserva de acuerdo con la naturaleza del producto manteniendo las temperaturas de almacenamiento.

10. EQUIPOS

- ✓ Incubadora a 35 0 C +/- 2 ° C
- ✓ Baño de agua a 80°C
- ✓ Congelador -10 y -20°C
- ✓ Gradillas

 <p>República de Colombia GOBIERNO DEPARTAMENTAL DE SANTANDER GOBERNACIÓN DE SANTANDER</p>	<p align="center">MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003</p> <p align="center">Laboratorio Departamental de Salud Pública</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	5 de 9

- ✓ Portaobjetos
- ✓ Microscopio
- ✓ Tubos tapa rosca de 150 x 15 mm estériles
- ✓ Micropipeta 100-1000 µl

11. REACTIVOS, CONTROLES Y MATERIALES DE REFERENCIA

- ✓ Agar sulfito polimixina sulfadiazina, SPS
- ✓ Agar triptosa sulfito cicloserina, TSC
- ✓ Reactivo coloración de Gram
- ✓ Agua peptonada 0.1%

12. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

1. Desinfectar con alcohol al 70% el sitio por donde se vaya a extraer la muestra.
2. Abrir aséptica y adecuadamente la muestra
3. Preparar la muestra: macerar, picar, mezclar y pesar 10gr representativos de la muestra total, en el frasco previamente marcado de dilución que contiene 90 ml de agua peptonada 0.1%, en una balanza previamente tarada, para obtener una dilución 10^{-1}
4. Mezclar muy bien la muestra para asegurar su homogenización antes de preparar las diluciones.
5. Preparar diluciones consecutivas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-n} , etc.) según el criterio.
6. Preparar la dilución 10^{-2} , tomando 1ml de muestra de la dilución 10^{-1} (es la dilución que contiene 90 ml de agua peptonada 0.1% y 10 g de la muestra) y transferirlos a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada 0.1%, agitar cuidadosamente.
7. Preparar la dilución 10^{-3} , transfiriendo 1ml de la dilución 10^{-2} , con micropipeta de 1000µl a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada 0.1%, agitar cuidadosamente.
NOTA: Repetir desde el paso 7 tomando la dilución inmediatamente anterior hasta obtener la dilución necesaria; cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración
8. Pipetear 1 ml de cada una de las diluciones en tubos estériles, previamente marcados.
9. Calentar los tubos con cada una de las diluciones a 80 °C por 10 minutos.

	MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	6 de 9
Laboratorio Departamental de Salud Pública			

10. Enfriar por 10 minutos en el congelador de -10 a -20 °C
11. Adicionar 5 ml de agar SPS o agar triptona sulfito cicloserina. Dejar solidificar, adicionar una segunda capa de medio 5 ml dejar solidificar.
12. Incubar a 35 ° C +/- 2 °C por 72 horas; en el caso de tubos, la incubación en jarra de anaerobiosis no es necesaria.

13. CONTROL DE CALIDAD DEL ANALÍTICO

Los ensayos se realizarán de acuerdo con el procedimiento de aseguramiento de la calidad de técnicas y medios de Cultivo, Preparación, esterilización y control de calidad de medios de cultivo MI-GS-GI-79, y registrar los datos de preparación en el formato control de medios de cultivo preparados MI-GS-RG-113. Para una mejor interpretación en los Resultados se observan los tubos mañana y tarde durante las 72 Horas relacionadas en la descripción del procedimiento.

14. ANÁLISIS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Hacer la lectura con base en los tubos que presenten 5-50 colonias de color negro. Cuando el número de colonias es alto, algunos tubos pueden ser ilegibles. En este caso, solo los tubos donde las colonias están claramente separadas deben ser considerados para el recuento.

Calcular el número total de colonias multiplicándolo por el inverso de la dilución.

Ejemplo: Si tengo 12 colonias y mi dilución fue 10^{-1} multiplicaría las 12 colonias contadas por 10; el resultado se expresa como 120 ufc/g o ml, si la dilución es 10^{-2} el número de colonias se multiplicaría por 100 y el resultado lo expresaría como 1200 ufc/g ó ml.

Se informará el resultado del Análisis en el formato de datos primarios.

Si no se observan colonias después de 72 horas se reporta como Menor de 10 ufc/g o ml.

15. EMISION DEL INFORME DE RESULTADOS

Los resultados se emiten en la plantilla que contiene información general del punto de toma, información de la muestra recibida y los análisis realizados.

Ver guía para el reporte de los resultados emitidos por el laboratorio de salud pública de Santander MI-GS-GI-31 en el inciso 5.3 Informe de resultados área atención al ambiente

	MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	7 de 9

alimentos

16. EXÁMENES COMPLEMENTARIOS

Este ensayo no requiere de análisis complementarios debido a que se reporta Recuento de esporas Clostridium Sulfito reductor

17. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- ✓ MERCK, Manual de Medios de Cultivo. 1994
- ✓ Manual de Técnicas de análisis para el control de calidad Microbiológico de alimentos para consumo humano.
- ✓ Procedimiento según International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).
- ✓ Análisis microbiológico de los alimentos; metodología analítica oficial, microorganismos indicadores 2014
- ✓ NTC 4834 Microbiología de alimentos y alimentos para animales, Método horizontal para el recuento de Clostridium sulfito Reductores e identificación de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias.
- ✓ International standard ISO 15213:2003 “Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions” First edition 2003-05-01

18. ANEXOS

Agar sulfito-hierro

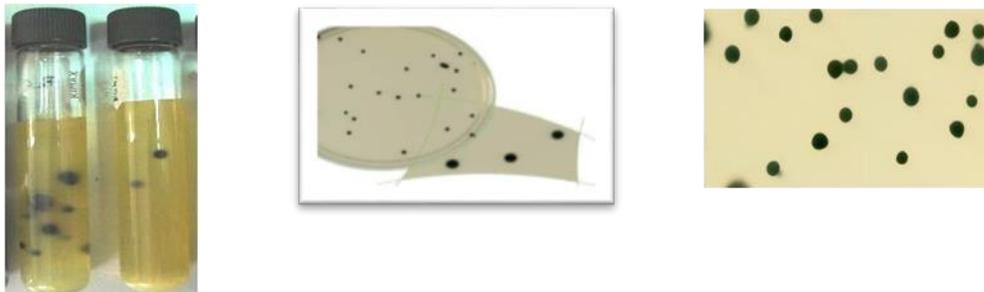


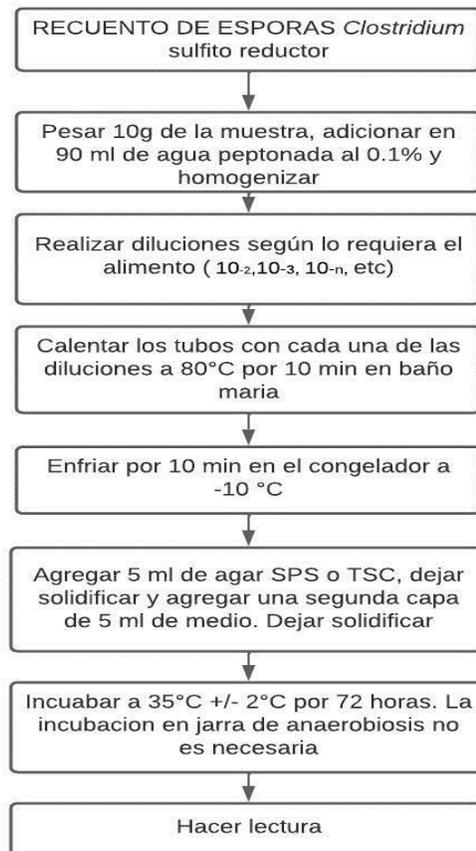
Imagen 1. Crecimiento de *Clostridium spp* en agar SPS

	MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003 Laboratorio Departamental de Salud Pública	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	8 de 9

18.1 PREPARACION DEL AGAR SELECTIVO PARA *Clostridium perfringens*.

AGAR	FORMULA	Gr/ ml	PREPARACIÓN
AGAR SELECTIVO PARA PERFRINGENS	Peptona de caseína Extracto de levadura Hierro (iii) citrato Sulfito de sodio Polimixina B sulfato Sulfadiazina sódica Agar-agar	15.0 10.0 0.5 0.5 0.5 0.01 0.12 13.9	Disolver 40 g en un litro de agua desmineralizada y calentar hasta ebullición agitando hasta que la disolución sea completa. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (seguir instrucciones de la casa comercial)

18.2 FLUJOGRAMA



 <p>República de Colombia DEPARTAMENTO DE SALUD GOBIERNO DE SANTANDER</p>	<p>MANUAL PARA RECuento DE ESPORAS CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTOR SEGÚN ISO 15213:2003</p> <p>Laboratorio Departamental de Salud Pública</p>	CÓDIGO	MI-GS-MA-28
		VERSIÓN	0
		FECHA DE APROBACIÓN	07/06/2022
		PAGINA	9 de 9

19. CONTROL DE CAMBIOS

CONTROL DE CAMBIOS				
VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN DEL CAMBIO	REVISÓ	APROBÓ
0	23/05/2022	Emisión inicial del documento	<p>ALBA ROCIO ORDUZ A Coordinador Grupo LSP</p> <p>GERMAN MARIN C Director de Salud Integral</p> <p>DIEGO A SANCHEZ BAEZ Coord. Grupo de Apoyo a la gestión y calidad.</p> <p>CESAR ERNESTO ARANDA Director de Planeación</p>	<p>JAVIER VILLAMIZAR SUAREZ Secretario de Salud de Santander</p>