



## DOCUMENTO GENERAL

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

# **Instructivo Técnico de análisis para detección de *Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas, tórulas de arrastre o calzas**

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

**Tabla de Contenidos**

<b>1</b>	<b>OBJETIVOS Y ALCANCE.</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS.</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>DEFINICIONES Y ABREVIATURAS.</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN.</b>	<b>4</b>
<b>4.1</b>	<b>Requisitos de personal.</b>	<b>4</b>
4.1.1	Responsable técnico.	4
4.1.2	Analistas.	5
<b>4.2</b>	<b>Requisitos Infraestructura, equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo.</b>	<b>5</b>
4.2.1	Equipos, instrumentos y materiales.	5
4.2.2	Reactivos, soluciones y medios de cultivo.	6
4.2.3	Estándares.	7
<b>4.3</b>	<b>Requisitos específicos.</b>	<b>7</b>
<b>4.4</b>	<b>Medios de verificación de requisitos.</b>	<b>8</b>
4.4.1	Solicitud de autorización.	8
<b>5</b>	<b>ANÁLISIS/ENSAYO.</b>	<b>11</b>
<b>5.1</b>	<b>Captación y envío de la muestra.</b>	<b>11</b>
<b>5.2</b>	<b>Recepción y manejo de la muestra.</b>	<b>11</b>
<b>5.3</b>	<b>Metodología.</b>	<b>12</b>
5.3.1	Preparación muestra y pre-enriquecimiento en medio líquido NO selectivo:	12
5.3.2	Enriquecimiento en medio selectivo semisólido:	12
5.3.3	Aislamiento en agar selectivo:	13
5.3.4	Selección de colonias para pruebas bioquímicas.	14
5.3.5	Interpretación de las pruebas bioquímicas.	15
5.3.6	Cuadro Interpretación de las pruebas bioquímicas.	16
5.3.7	Confirmación basada en la identificación de antígenos somáticos (O) de <i>Salmonella</i> .	17
5.3.8	Confirmación basada en la identificación de antígeno flagelar (H) de <i>Salmonella</i> .	18
5.3.9	Tabla de interpretación de las pruebas de confirmación.	19
<b>5.4</b>	<b>Expresión de los resultados.</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS.</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS.</b>	<b>21</b>
<b>8</b>	<b>OBLIGACIONES.</b>	<b>22</b>
<b>9</b>	<b>FORMULARIOS Y OTROS.</b>	<b>22</b>
<b>9.1</b>	<b>Formularios relacionados.</b>	<b>22</b>
<b>9.2</b>	<b>Diagrama de flujo para clasificación de un pabellón/sector positivo a <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Tiphymurium y <i>Salmonella</i> Tiphymurium monofásica.</b>	<b>23</b>

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

**1 OBJETIVOS Y ALCANCE.**

El objetivo del instructivo es dar a conocer los requisitos específicos para la autorización de laboratorios por parte del SAG para la realización del análisis/ensayo para el diagnóstico de *Salmonella* spp. mediante el método tradicional de cultivo descrito en la ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas, tórulas de arrastre o calzas a partir de muestras oficiales provenientes de planteles comerciales de aves adscritos al Sistema de Autocontrol Obligatorio (SAO) de *Salmonella* spp. en granjas de abuelas/reproductoras y aves de engorde de broiler y pavos.

Del mismo modo, en este documento se estipulan instrucciones técnicas que deben cumplir los laboratorios para que obtengan y mantengan tal autorización.

**2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS.**

- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. Versión vigente. "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002. Directrices para la aplicación de NCh-ISO 17025 en los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97. Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones - Parte 1: Análisis físico-químicos y microbiológicos en procesos industriales.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Versión vigente.
- Manual de Técnicas Diagnósticas y vacunas de animales terrestres, OIE Edición, 2016.
- ISO 11133:2014 "Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media" o Norma Chilena equivalente. Versión vigente.
- Resolución Exenta N° 3.687 de 2020, del Servicio Agrícola y Ganadero, que establece el Programa Oficial de Control y Reducción de *Salmonella* en Cadenas de Producción Avícola de Carnes.
- Resolución Exenta N° 90 de 2014, del Servicio Agrícola y Ganadero, que aprueba el Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo o la que la reemplaza.
- Resolución 2401 de 2021. Exenta. Aprueba Documentos Generales para los Sistemas de Autocontrol de *Salmonella* spp. en Granjas de Aves.
- Resolución Exenta N° 3.571 de 2020, del Servicio Agrícola y Ganadero, que aprueba el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros. <sup>[1]</sup><sub>[SEP]</sub>
- Instructivo Técnico para la Colecta y Envío de Muestras de Aves para Diagnóstico de Laboratorio. Versión vigente.
- Norma ISO 6579-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp. Modificación 1: Ampliación del rango de temperaturas de incubación, modificación del estado del Anexo D y corrección de la composición de los medios MSRV y SC. (ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020).

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

### 3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS.

<b>AL</b>	Analista Laboratorio
<b>Protocolo Oficial</b>	“Registro de Protocolo Oficial SAG” (RPO): Documento emitido por el Médico Veterinario Oficial del SAG o Médico Veterinario Autorizado. (RPOA): Registro protocolo oficial Aves.
<b>SAG</b>	Servicio Agrícola y Ganadero
<b>Laboratorio Oficial</b>	Laboratorio perteneciente al Servicio Agrícola y Ganadero.
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal.
<b>MVO</b>	Médico Veterinario Oficial del SAG.
<b>MVA</b>	Médico Veterinario Autorizado.
<b>INN</b>	Instituto Nacional de Normalización.
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization.
<b>SSA</b>	Sistema de Sanidad Animal

### 4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN.

#### 4.1 Requisitos de personal.

Las personas jurídicas interesadas en postular a la autorización en esta área, deben cumplir con todo lo establecido, tanto en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo como lo definido en el presente Instructivo Técnico. Además, deberá contar con servicios permanentes de profesionales capacitados y competentes para la Detección de *Salmonella* spp. según ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020.

##### 4.1.1 Responsable técnico.

Según lo dispuesto en el número 4.2 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios análisis/ensayo, el laboratorio debe contar con un responsable técnico, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado, el cual debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Poseer título profesional universitario otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera profesional del área Biológica. En caso de título obtenido en el extranjero, éste debe estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación
- Haber recibido capacitación en la realización del método *Salmonella* spp. mediante ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020 en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la autorización comprobada mediante certificado correspondiente.
- Debe estar capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh- ISO 17025, versión vigente.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar, a través de la ejecución de un número de muestras positivas y negativas.

El responsable técnico debe tener un subrogante, el que debe cumplir con los mismos requisitos indicados anteriormente.

#### **4.1.2 Analistas.**

El laboratorio deberá contar con analistas en número adecuado de acuerdo a la cantidad de análisis a realizar, quienes deben cumplir el siguiente perfil:

- Contar con título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización.
- Haber recibido capacitación en la realización del método *Salmonella* spp. mediante ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020 en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la autorización comprobada mediante certificado correspondiente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar, a través de la ejecución de un número de muestras positivas y negativas.
- Deben estar capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes a la NCh- ISO 17025, versión vigente.

#### **4.2 Requisitos Infraestructura, equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo.**

El postulante debe contar con la infraestructura requerida para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance de la autorización, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh- ISO 17025, versión vigente.

Equipamiento básico para realizar las actividades comprendidas en el alcance de la autorización, de acuerdo a requisitos señalados en NCh- ISO 17025, versión vigente.

El Laboratorio debe poseer infraestructura adecuada a un nivel Bioseguridad 2, de acuerdo a Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá (Versión Vigente).

##### **4.2.1 Equipos, instrumentos y materiales.**

- Agitador de tubos o vortex.
- Asa de nicrom de aro de 3 mm (10  $\mu$ l) de diámetro y asa en punta (o desechables).
- Asas desechables estériles de 1  $\mu$ l.
- Autoclave.
- Tubos de Ensayo.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

- Balanza digital.
- Bolsas de plástico estériles resellables para Stomacher.
- Estufa de cultivo 34° a 38°C (36° ± 2°C).
- Estufa de cultivo 41.5° ± 1°C.
- Frascos Schott.
- Gabinete de Bioseguridad Clase II.
- Guantes desechables estériles.
- Lámpara o lupa con luz.
- Pipetas bacteriológicas desechables 10 y 1 ml.
- Micropipetas (10-100 ul) o (1000 ul)
- Puntas para micropipetas.
- Placas Petri plásticas desechables.
- Gotarios estériles desechables.
- Placas de vidrio para aglutinación.
- Propipetas.
- Refrigerador 5±3°C.
- Stomacher.
- Toalla de papel absorbente.
- Pissetas.
- Baño termoregulado 47°-50 °C.
- Densicheck

**4.2.2 Reactivos, soluciones y medios de cultivo.**

- Agua Peptonada Tamponada ISO (APT). Frascos Schott 90 ml (u otro volumen necesario para análisis).
- Agar Modificado Semisólido Rappaport-Vassiliadis con Soya (MSRV) y Novobiocina (10 mg/L).
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) en placas de 90 o 100 mm.
- Agar Verde Brillante (BGA) u otro complementario al XLD.
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).
- Agar Urea.
- Agar Tripticasa Soya. (TSA) o Agar Nutritivo (AN).
- Antisueros Somáticos (O) Polivalente A – I & Vi para *Salmonella* spp.
- Antisueros Somáticos (O) Monovalentes para *Salmonella* spp. (Grupos A- I & Vi.
- Antisuero Flagelar (H) Polivalente (A-Z) para *Salmonella* sp.
- API 20 E de Biomerieux® u otro equivalente y reactivos correspondientes.
- Solución de suero fisiológico al 0.85%.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

- Solución de suero fisiológico al 0.85% con formalina al 0.6%.
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1%.
- Formalina al 0.6%
- Reactivo de Kovacs.
- Discos ONPG.

NOTA: La preparación de los medios de cultivo mencionados anteriormente debe ser de acuerdo a lo señalado en ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020, "Microbiology of food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* spp".

#### **4.2.3 Estándares.**

Se utilizarán como estándares Cepas ATCC de una *Salmonella* spp H<sub>2</sub>S negativa y otra H<sub>2</sub>S positiva, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726 Of. 2002. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo. Además, pueden ser necesarias otras cepas ATCC para ser utilizadas como controles positivos o negativos de las pruebas bioquímicas. Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse como controles positivos y negativos las cepas ATCC recomendadas por el fabricante de cada medio.

#### **4.3 Requisitos específicos.**

Los laboratorios, deben contar con un sistema de aseguramiento de calidad implementado, siguiendo las directrices de la NCh- ISO 17025, versión vigente.

El laboratorio debe demostrar que cuenta con la metodología acreditada bajo las NCh- ISO 17025. Sin perjuicio de lo anterior, para aquellos casos en que, al momento de postular, el laboratorio no tenga acreditada la técnica según la ISO 17.025, ésta será autorizada por el Servicio siempre y cuando el laboratorio posea documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de NCh- ISO 17025, versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos o por otra entidad internacional acreditadora para la NCh- ISO 17025, versión vigente, reconocida por la International Organization for Standardization.

El Servicio otorgará al laboratorio 2 años para logre la acreditación de esta técnica acuerdo a la NCh- ISO 17025 ante el INN u otro organismo de acreditación, plazo que se contabiliza desde la fecha en que se obtenga la autorización del SAG. No obstante, lo anterior, se deberá presentar la solicitud de acreditación de la técnica ante el organismo acreditador dentro de los tres (3) meses siguientes a la fecha de la resolución SAG de autorización del laboratorio. El laboratorio deberá acompañar una carta dirigida al SAG haciendo ver esta situación y comprometiéndose a presentar la solicitud de acreditación. En caso de perder la acreditación de la técnica/análisis o de no realizar dicha postulación, la técnica/análisis será eliminada del registro de autorización.

El laboratorio deberá indicar su capacidad diagnóstica, señalando el número de muestras que ejecuta por análisis y cantidad de analistas competentes para este alcance.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

El laboratorio deberá presentar la documentación necesaria que avale la verificación interna efectuada para la metodología señalada en el presente instructivo. La verificación debe incluir los parámetros técnicos descritos en la Norma ISO 16140- 3, versión vigente.

El laboratorio debe contar con los siguientes documentos:

1. Procedimiento/Instructivo Manejo de muestras involucrados en el alcance de autorización.
2. Procedimiento e Instructivos Preparación de Medios de cultivo involucrados en el alcance de autorización.
3. Procedimiento/Instructivo Preparación y Esterilización de Material de vidrio.
4. Procedimiento/Instructivo Eliminación y Descontaminación de Residuos y Materiales.
5. Procedimiento/Instructivo Aseo y Limpieza de Laboratorios.
6. Procedimiento/Instructivo Control Biológico de Esterilidad en Autoclaves.
7. Procedimiento/Instructivo de Verificación de Equipos.
8. Procedimiento/Instructivo Control de Material de Lavado.
9. Procedimiento/Instructivo Control de Calidad Interno.
10. Procedimiento/Instructivo Control de Ambiente.
11. Procedimiento/Instructivo Manejo de Cepas Control.
12. Lista Maestra de Equipos e Instrumentos de medición involucrados en el alcance de Autorización.
13. Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de autorización.
14. Programa de Mantenimiento/Verificación/calibración de los equipos involucrados en el alcance de autorización.
15. Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales.
16. Demostración de competencia en la metodología a autorizar para todo el personal del alcance. El informe debe incluir número de análisis positivos y negativos realizados por cada analista, Responsable técnico y su subrogante, incluyendo el proceso de confirmación.

El cumplimiento de estos requisitos será confirmado por el Servicio en la revisión documental del proceso de postulación y en la auditoría de verificación o por los medios que considere idóneos para tal efecto.

#### **4.4 Medios de verificación de requisitos.**

##### **4.4.1 Solicitud de autorización.**

El laboratorio solicitante deberá presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad, implementado en el laboratorio y que demuestren la



**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella spp.* según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

acreditación en NCh-ISO 17025. Versión vigente. el INN, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos.

Algunos de los formularios citados se encuentran en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo.

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de autorización (F-GF-CGP-PT-068), además de los antecedentes establecidos en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG en este capítulo.

Cuando se trata de la primera autorización de laboratorios, se debe presentar el dossier legal según lo establecido en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, junto con el dossier técnico. Cuando se trata de una ampliación de alcance, solo es necesario presentar el dossier técnico. En relación a este último, la documentación a presentar es la siguiente:

**A. Dossier técnico** (obligatorio):

- Documentación indicada en el Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo.
- Documentación que demuestre la capacitación y competencia técnica del responsable técnico, su subrogante y de los analistas involucrados en la técnica del alcance de autorización, según lo descrito en el numeral 4.1 de este Instructivo.
- Lista de responsables técnicos (titular y subrogante) y de los analistas vinculados a la(s) técnica(s) del alcance de la autorización, de acuerdo al formulario F-ATR-AAT-287. El listado debe incluir a todo el personal a autorizar en el análisis/ensayo.
- Currículo del responsable técnico, su subrogante y de los analistas, involucrados en el alcance de autorización.
- Certificado de título del responsable técnico, su subrogante y de los/los analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Copia del manual de aseguramiento de la calidad del laboratorio, si su sistema de aseguramiento de la calidad lo posee.
- Organigrama de personal, indicando los nombres, profesión y cargos del responsable técnico titular, su subrogante y de los analistas participantes en el análisis/ensayo autorizado.
- Copia simple del plano del laboratorio, donde se identifiquen las áreas del laboratorio y los accesos y ubicación de equipos, indicando flujo entre áreas limpias y sucias. Especial énfasis en las áreas físicas relacionadas con la autorización, incluyendo áreas de recepción de muestras, de realización de análisis, áreas de incubación, de descontaminación, bodegas de insumos y áreas de almacenamiento de medios de cultivo y materiales de referencia.
- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas (flujo de áreas limpias y sucias y ubicación de equipos).

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

- Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención y calibración de estos.
- Lista de materiales, reactivos y Kits.
- Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance.
- Documentos que acrediten la capacitación tanto del responsable técnico como de los analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Procedimientos y/o Instructivos específicos e informes de verificación de método y de competencia técnica del personal, señalados en el numeral 4.1 de este Instructivo.
- El dossier técnico presentado para la postulación debe incluir toda la información solicitada en los numerales 4.1, 4.2 y 4.3 del presente Instructivo técnico. La falta de algún documento ocasionará el rechazo de la postulación.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo como en este instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación de requisitos, a través de los medios que considere idóneos para tal efecto.

Con este fin, el SAG podrá someter al responsable técnico y a uno o más analistas identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica.

**B. Dossier legal:**

El dossier legal y de antecedentes generales sólo se debe presentar en el caso de que sea la primera autorización en el ámbito de laboratorios de análisis/ensayo. Se hace presente, además, que los formularios que se citan a continuación se encuentran en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo:

- Fotocopia por ambos lados de la cédula de identidad del postulante.
- Fotocopia del rol único tributario de la persona jurídica y de la cédula de identidad por ambos lados, del respectivo representante legal o documento de identificación oficial para el caso de extranjeros.
- Declaración jurada simple, según formatos establecidos en los formularios F-ATR-AAT-312, para personas naturales y jurídicas.
- Copia del comprobante de del pago realizado por concepto de postulación a la autorización ante el SAG, de acuerdo al sistema tarifario vigente.
- Autorización de publicación de datos de terceros autorizados ante el SAG, para fines institucionales, firmada por el/la postulante o su representante legal en el caso de tratarse de persona jurídica (F-ATR-AAT-314).
- Fotocopia de la escritura social de constitución, con sus respectivas modificaciones si las hubiere, fotocopia de la publicación de extracto respectivo cuando corresponda, y certificado de vigencia de la persona jurídica emitido por la autoridad competente. Al momento de la postulación este certificado deberá tener una antigüedad no superior a 30 días corridos.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

- Documento que acredite la personería del representante legal para actuar en nombre del postulante, y certificado de vigencia del mandato con una antigüedad no superior a 30 días corridos.
- Adicionalmente, y de conformidad con la ley N° 19.913, que crea la Unidad de Análisis Financiero y modifica diversas disposiciones en materia de lavado y blanqueo de activos, el laboratorio postulante debe presentar la "Declaración de vínculo con personas expuestas políticamente (PEP)", conforme al formato establecido por la Unidad de Análisis Financiero (UAF) del Ministerio de Hacienda, que se encuentra disponible en su sitio web, <https://www.uaf.cl/legislacion/politica.aspx>.

## **5 ANÁLISIS/ENSAYO.**

### **5.1 Captación y envío de la muestra.**

La toma de las muestras no es una actividad incluida en la competencia del laboratorio autorizado para este análisis.

Para este tipo de análisis no se utilizarán contramuestras.

Las muestras deben ser recolectadas asépticamente y antes de comenzar cualquier tratamiento con antibióticos.

Las muestras enviadas a un Laboratorio Autorizado para análisis de *Salmonella* spp., mediante aislamiento bacteriano, serán responsabilidad de un Médico Veterinario Autorizado o de un Médico Veterinario Oficial del SAG. En todos los casos, la muestra siempre debe ir acompañada del Protocolo Oficial de Toma de muestras el cual debe ser completado con todos los datos que en dicho protocolo se solicitan.

Las muestras a recolectar serán fecas, tórulas de arrastre o calzas, provenientes de los Planteles de aves incluidos en el punto 1 de este Instructivo según lo señalado en el Instructivo de Toma de Muestras de aves, correspondiente.

- El sistema genera un número de protocolo único que debe ir señalado por fuera de la caja isotérmica
- Todo el proceso es generado e informado mediante la plataforma <http://sanidadanimal.sag.gob.cl/>. La generación del "Registro de Protocolo animal Oficial" es realizada por el médico veterinario autorizado u oficial.

### **5.2 Recepción y manejo de la muestra.**

La recepción y manejo de las muestras en el laboratorio debe realizarse cumpliendo al menos lo siguiente:

- Integridad de las muestras.
- Cantidad suficiente de muestras para el análisis.
- Identificación adecuada
- Deben venir refrigeradas y que no excedan las 36 horas desde su recolección.
- Temperatura de las muestras al momento de recepción (Rango aceptado: 2° a 8 °C).

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

- Material de envase adecuado (Bolsas estériles bien selladas, frascos con cierre que impida el extravasado de líquidos, etc.)
- Material refrigerante sin ruptura ni con extravasación de contenido.
- Contenedor isotérmico con sello SAG intacto e identificado.

### **5.3 Metodología.**

#### **5.3.1 Preparación muestra y pre-enriquecimiento en medio líquido NO selectivo:**

El día del procesamiento de las muestras, se coloca la balanza digital en el interior del gabinete de bioseguridad. Luego mediante el uso de instrumental estéril, se pesa cada muestra y se agrega la cantidad de Agua Peptonada Tamponada ISO (APT) necesaria en proporción de 1/10, por ejemplo, a  $25 \pm 0.5$  g de la muestra de fecas a analizar, se le agrega 225 ml. de APT. Esto se realiza en una bolsa plástica resellable estéril para stomacher. La muestra no debe ser inferior a 10 gramos.

- Inocular la muestra en Agua Peptonada Tamponada ISO (APT), previamente mantenida a temperatura ambiente. Incubar a  $36^\circ \pm 2^\circ\text{C}$  ( $34^\circ$  a  $38^\circ\text{C}$ ) durante  $18 \pm 2$  h.
- ***Está permitido almacenar muestras pre-enriquecidas después de la incubación, a  $5^\circ \pm 3^\circ\text{C}$  por un máximo de 72 horas.***
- Inocular los controles positivos, posterior a la siembra de las muestras.

#### **5.3.2 Enriquecimiento en medio selectivo semisólido:**

- Se debe asegurar que las placas de Agar Modificado Semisólido Rappaport-Vassiliadis con Soya (MSRV) se encuentren a temperatura ambiente. Secar la superficie de éstas si se encuentran húmedas previo a la siembra.

Desde el caldo de APT obtenido desde el Punto 5.3.1., mediante una pipeta estéril desechable, tomar un volumen total de 0,1 ml. (distribuir el equivalente a tres gotas). Luego distribuir esta cantidad, sobre la superficie de las placas de MSRV, en tres puntos dispuestos en forma separada y equidistante entre sí.

**NOTA:** Cuando se proceda a tomar el subcultivo desde el APT, es muy importante no levantar el material particulado de la muestra. Por lo tanto, los contenedores deben ser movidos cuidadosamente, sin mezclar ni batir. ***Se debe extraer el inóculo desde la interfase sin material particulado entre la muestra y la superficie del caldo de cultivo.***

- Incube las placas de MSRV inoculadas a  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ . durante  $24 \pm 3$  hr.
- **NO INVERTIR LAS PLACAS.**
- Observar las placas de MSRV sobre una superficie clara o una luz blanca.
- Las placas **sospechosas mostrarán una zona de turbidez de color blanco grisáceo**, extendida alrededor de la gota inoculada. La zona de turbidez se caracteriza por un halo blanco, con un borde claramente definido.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

- **Si no se observa desarrollo** en la placa a las 24 hr., se deben incubar nuevamente por otras  $24 \pm 3$  hr.

**5.3.3 Aislamiento en agar selectivo:**

- Con el cultivo obtenido desde el Punto 5.3.2., inocular el contenido del asa (1  $\mu$ l) en los siguientes dos medios selectivos sólidos (una asada en cada medio):
  - Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
  - Medio selectivo complementario al agar XLD, por ejemplo, BGA. Este medio debe ser seleccionado, basándose en aquellas características que sean diferentes a las entregadas en el agar XLD, por ejemplo, lactosa positiva, H<sub>2</sub>S negativas, etc.

- Se debe asegurar que las placas de agar XLD y el segundo medio selectivo se encuentren a temperatura ambiente. Secar la superficie de éstas antes del uso, si se encuentran húmedas.

A partir del crecimiento positivo que se observe en el agar MSR/V, determinar el punto más alejado de crecimiento desde los puntos de inoculación e introducir un asa de 1  $\mu$ l justo dentro del borde del halo de crecimiento opaco. Retirar el asa, asegurándose de que no arrastrar restos de agar MRSV. Con el asa, inocular la superficie de la placa de XLD de manera de obtener colonias aisladas.

- Proceder de la misma manera para inocular la superficie del otro medio selectivo utilizando otra asa de cultivo estéril.
- Incubar las placas de XLD a  **$36^{\circ} \pm 2^{\circ}C$  ( $34^{\circ} - 38^{\circ}C$ )** por  $24 \pm 3$  horas e incubar las placas del medio selectivo complementario, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Regrese las placas negativas de MSR/V a la incubadora  $41,5^{\circ} \pm 1^{\circ}C$  e incube durante otras  $24 \pm 3$  horas. Realice el procedimiento de siembra en agar selectivo descrito anteriormente si, después de 48 horas de incubación, estas placas MRSV se tornan positivas.
- Las colonias típicas de *Salmonella* spp. H<sub>2</sub>S positivas, se observan de la siguiente manera:

- **Agar XLD** tienen un centro negro, rodeado de una zona ligeramente transparente de color rojizo, debido al cambio de color del indicador del medio.

Las variantes de *Salmonella* **H<sub>2</sub>S negativas** crecen en agar XLD de color rosado con un centro rosa oscuro. Las cepas **lactosa positivas** de *Salmonella* crecen en agar XLD de color amarillo con o sin centro negro.

- **Agar BGA:** colonias rosadas, opacas, de apariencia lisa y de bordes netos, rodeadas por el color rojo del medio. Si se utiliza otro medio secundario selectivo, revisar las colonias sospechosas de *Salmonella*, de acuerdo a las especificaciones entregadas por el fabricante
- **NOTA:** El reconocimiento de colonias de *Salmonella* se adquiere con la experiencia, ya que su apariencia puede variar no sólo según la serovariedad que sea, sino que además del batch de medio de cultivo selectivo utilizado.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

**5.3.4 Selección de colonias para pruebas bioquímicas.**

- Marcar las colonias sospechosas de cada placa. Seleccionar **al menos una colonia típica o sospechosa para la confirmación**. Si ésta resulta negativa, seleccionar **hasta 4 colonias sospechosas**, asegurando que dichas colonias provengan de **diferentes combinaciones de los medios de enriquecimiento selectivo y agares selectivos**.
- Estriar las colonias seleccionadas, sobre la superficie de placas con TSA o AN previamente secadas, de manera que se permita el desarrollo de colonias aisladas. Incubar las placas inoculadas a **36°± 2°C (34°C a 38°C)** por 24 ± 3 horas.
- Alternativamente, si se dispone de colonias bien aisladas (cultivo puro) desde las placas de agar selectivo, la confirmación bioquímica se puede realizar tomando directamente una colonia sospechosa y bien aislada. La etapa de cultivo en el medio de agar no selectivo, se puede realizar en paralelo con la realización de las pruebas bioquímicas, para verificar la pureza de la colonia tomada del medio de agar selectivo.
- Usar cultivos puros para la confirmación bioquímica y serológica.
- Inocular cada una de las colonias seleccionadas en Agar TSI, LIA, MIO, Agar Urea y en dos tubos de TSA. Además, se puede realizar la prueba de ONPG en forma **opcional**.

Para lo anterior, tocar suavemente la superficie y el centro de la colonia sospechosa con el asa en punta, luego inocular el TSI en profundidad y estría en superficie. Sin flamear nuevamente (siempre utilizando la misma colonia seleccionada), inocular el tubo de agar LIA, pinchando dos veces en profundidad y hacer estría en superficie. Luego inocular el agar MIO en picadura. Posteriormente, inocular el agar Urea por estría en superficie.

- Inocular, además dos tubos de agar TSA en estría en la superficie. Uno de los tubos de agar TSA se ocupa para realizar la confirmación serológica somática y el otro se debe mantener en refrigeración para, en caso de ser necesario, realizar la serotipificación.

Evitar tocar con el asa el agar, ya que los medios altamente selectivos suprimen el crecimiento de algunos organismos que pueden estar presentes.

- Finalmente, si es necesario, realizar la prueba de detección de β galactosidasa utilizar discos ONPG, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Incubar todos los medios utilizados para la batería bioquímica a **36°±2°C (34-38°C)** por 24 ± 3 hrs. (Para detección de β galactosidasa considerar temperatura indicada por el fabricante del ONPG).

La interpretación de las pruebas bioquímicas y serológicas, indicarán si el aislado pertenece al género *Salmonella* spp.

Para una distinción clara entre las reacciones bioquímicas positivas y negativas, es útil **verificar cada prueba bioquímica a través del uso de cepas con control positivo y negativo bien caracterizadas**.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

**5.3.5 Interpretación de las pruebas bioquímicas.**

**5.3.5.1 Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).**

• **Fondo:**

- Fermentación de la glucosa:
  - Fermenta la glucosa: Fondo Amarillo (A).
  - No fermenta la glucosa: Fondo rojo o sin cambios (K).
- Producción de gas:
  - Produce gas a partir de la glucosa: Ruptura o desplazamiento del agar.
  - No produce: Sin cambios.
- Producción de H<sub>2</sub>S (Sulfuro de Hidrógeno):
  - Produce H<sub>2</sub>S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
  - No produce: Sin cambios.

• **Superficie Inclinada (Tendido):**

- Fermentación de la lactosa y/o sacarosa:
  - Fermenta estos azúcares: Tendido Amarillo (A).
  - No fermenta: Tendido rojo o sin cambios (K).

**Notas:**

- La mayor parte de las *Salmonella* típicas muestran: Fondo ácido (amarillo) y tendido alcalino (rojo), con formación de gas (burbujas) y (en el 90% de los casos) formación de Sulfuro de Hidrógeno (H<sub>2</sub>S), que ennegrece el agar.
- Cuando la *Salmonella* es Lactosa positiva, el tendido del TSI es de color amarillo.
- La confirmación preliminar de los cultivos de *Salmonella*, no se puede basar sólo en los resultados de la prueba de agar TSI.

**5.3.5.2 Agar Hierro Lisina (LIA).**

- Descarboxilación de la lisina
  - Descarboxila la lisina: Fondo y tendido púrpura (K/K).
  - No descarboxila la lisina: Fondo amarillo (A).
- Producción de gas
  - Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
  - No produce gas: sin cambios.
- Producción de H<sub>2</sub>S
  - Produce H<sub>2</sub>S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
  - No produce H<sub>2</sub>S: Sin cambios.
- Desaminación de la lisina
  - Desamina la lisina: Tendido rojo (R).
  - No desamina: Tendido púrpura (K).
- **Nota:** La mayor parte de las *Salmonella* típicas muestran una reacción positiva en el LIA (Descarboxilación de la lisina).

**5.3.5.3 Agar Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).**

- Movilidad

**Instructivo Técnico de análisis para detección de *Salmonella spp.* según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas, tómulas de arrastre o calzas**

Los microorganismos inmóviles sólo crecen en la línea de siembra y los móviles se reconocen por su desarrollo difuso alejado de la línea de inoculación.

- Producción de Indol\*

Produce Indol: Formación de un anillo rojo o rosado al agregar Reactivo de Kovacs.  
No produce Indol: Anillo de color amarillo.

\* El reactivo de Kovacs se añade después de la lectura de la movilidad y la ornitina.

- Descarboxilación de la Ornitina

Descarboxila la ornitina: Coloración azul, de intensidad variable.  
No descarboxila la Ornitina: Coloración amarilla.

**Nota:** La mayor parte de las *Salmonella spp.* muestran una reacción de movilidad positiva, Indol negativa (a diferencia de *E. coli* y *Citrobacter* que son Indol positivas, pero pueden dar reacciones típicas sobre los medios de aislamiento de *Salmonella*) y Ornitina positiva (Descarboxilación).

#### 5.3.5.4 Actividad Ureasa.

- Si la reacción es positiva, la división de la urea libera amonio, el cual cambia el color del rojo de fenol del medio a color rosado y más tarde a color cereza profundo. La reacción es a menudo es aparente después de las 2 a 4 horas.
- Si la reacción es negativa se mantendrá el color amarillo del medio.

#### 5.3.5.5 Detección de $\beta$ Galactosidasa.

- Utilizar los discos de ONPG siguiendo las instrucciones del fabricante.

**Nota:** La mayor parte de las *Salmonella* típicas dan una reacción negativa a  $\beta$  galactosidasa (sin color).

Sin embargo, la *Salmonella entérica subespecie arizonae* y *diarizonae*, presentan una reacción positiva a la  $\beta$  galactosidasa (color amarillo).

#### 5.3.6 Cuadro Interpretación de las pruebas bioquímicas.

Agar TSI			Agar LIA			Agar MIO			Agar Urea	ONPG	Microorganismo
Tendido/ Fondo	GA S	H <sub>2</sub> S	Tendido/ Fondo	GA S	H <sub>2</sub> S	Mo v	Ind ol	Ornitina			
K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella</i> subespecie I  Otras <i>Salmonella</i>



**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

K/A	-	-	K/K	+	-	+	-	+	-	-	<i>S. Choleraesuis</i>  <i>Otras Salmonella</i>
K/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	-	-	<i>Salmonella</i> <i>Typhi</i>
K/A	+	-	K/A	+	-	+	-	+	-	-	<i>Salmonella</i> <i>spp</i>  <i>S.Paratyphi A.</i>
K/A	-	-	K/A	-	-	+	-	+	-	-	<i>S.Paratyphi A.</i>
K/A	-	+	K/A	-	+	-	-	+	-	-	<i>S. Typhi</i> (excepción)
A/A	+	+	K/K	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> subg. III (Arizona)
K/A	+	+	K/K	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> subesp.I  <i>Salmonella</i> subg. III (Arizona)
K/A	+	+	K/A	+	+	+	-	+	-	+	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>  <i>Citrobacter</i> <i>freundii</i> *

\* Puede dar reacciones similares.

**NOTA:** En TSI y LIA la lectura corresponde a tendido / fondo.

**5.3.7 Confirmación basada en la identificación de antígenos somáticos (O) de *Salmonella*.**

- Someter a confirmación serológica todas las colonias que cumplan con las pruebas bioquímicas características para el género *Salmonella* sp., de acuerdo a lo descrito en el numeral 5.3.5 y Cuadro 5.3.6.
- Se ocupa uno de los tubos de agar tripticasa soya (TSA) inoculados junto a la batería bioquímica. Se suspende el cultivo con aproximadamente 3- 5 ml de solución salina al 0.85%. De tal manera de obtener una suspensión densa.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

- Confrontar sobre la placa de vidrio para aglutinación, mediante el uso de gotarios estériles, una gota de suspensión del cultivo con una gota del antisuero somático Polivalente A-I & Vi. Como control agregar solamente una gota de suspensión del cultivo para detectar si se produce autoaglutinación de la cepa estudiada. Mezclar con una varilla plástica o mango del asa desechable estéril.
- Mover la placa de vidrio para aglutinación con 20 vueltas de vaivén por alrededor de 30 a 60 segundos, observando la presencia de grumos con una lámpara contra fondo oscuro y con la ayuda preferentemente de una lupa. Si la bacteria se ha agrupado en unidades más o menos diferenciables, el cultivo se considera autoaglutinante.
- Si la cepa autoaglutina NO puede ser seroagrupada y necesita pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por API 20 E o equivalente.
- Se debe tener la seguridad de ocupar colonias puras y no utilizar colonias autoaglutinantes. En caso de ser necesario, la colonia se puede traspasar a agar sangre, purificar y posteriormente realizar API 20 E.
- Si las suspensiones bacterianas de las cepas en estudio aglutinan con el suero polivalente somático A-I & Vi, corresponden al género *Salmonella* spp. Posteriormente, para identificar el serogrupo, se debe repetir el procedimiento descrito anteriormente, realizando aglutinaciones con los sueros monovalentes somáticos, desde el grupo A hasta el I.
- Si se utiliza un antisuero somático Polivalente A-I & Vi, y si existe aglutinación (reacción positiva), pero posteriormente la cepa no aglutina con los antisueros monovalentes somáticos A-I, es posible que ésta tenga cápsula. En caso de disponer del antisuero Vi, realizar la aglutinación, si ésta es positiva, proceder a destruir la cápsula, hirviendo la suspensión bacteriana por 15 minutos a 1 hora en baño de agua. Luego, confrontar nuevamente una gota de los antisueros monovalentes somáticos A-I con una gota de suspensión del cultivo tratado por calor. Mezclar con asa desechable estéril.

**5.3.8 Confirmación basada en la identificación de antígeno flagelar (H) de  
*Salmonella*.**

- Inocular el cultivo proveniente del agar TSA en 5 ml de Caldo tripticasa soya (CTS). Incubar a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C durante 18 a 24 horas o hasta que el desarrollo bacteriano alcance una densidad de 3 en la escala de Mc Farland.
- Adicionar al CTS inoculado, 5 ml. de solución salina que contenga 0.6% de formalina y dejar reposar 1 hr. En dos tubos distribuir 1 ml. de esta preparación (colocar 0,5 ml en cada tubo).
- Luego, a uno de los tubos agregar 0.5 ml de antisuero polivalente H a dilución de trabajo, de acuerdo a instrucciones del fabricante. El otro tubo usarlo como control de autoaglutinación.
- **NOTA:** Ejemplo: Antisuero Flagelar H, polivalente A-Z Difco, se utiliza en una dilución 1:25. Añadiendo 0,1 ml de antisuero reconstituido a 2.5 ml de solución de NaCl al 0.85%. Realizar esta dilución al momento de su uso. Al mezclar cantidades iguales de antisuero diluido y aislado de prueba, la dilución final es de 1:100.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de *Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas, tómulas de arrastre o calzas**

- Incubar ambos tubos a 47°- 50° C en baño de agua, hasta 1 hora. Evitar agitarlos en exceso.
- Sacar los tubos del baño termorregulado, evitando agitarlos en exceso antes de efectuar la lectura de la reacción.
- Efectuar la lectura en el tubo de autoaglutinación para verificar la presencia de flóculos. Si esta reacción es positiva, la prueba de aglutinación no es válida, por lo tanto, no se debe proceder a la lectura del tubo de prueba. Si no hay evidencia de floculación en el tubo, proceder a la lectura del tubo de prueba.
- En el tubo de prueba observar la **presencia o ausencia de flóculos**. Su presencia indica un resultado positivo. Su ausencia indica un resultado negativo.
- Opcionalmente, se puede usar el Test de Látex para *Salmonella* de Oxoid (seguir las instrucciones del fabricante).

**NOTA: Una cepa de *Salmonella* móvil debería dar reacción positiva a la aglutinación, al ser enfrentada con el antisuero Polivalente Flagelar H.**

**5.3.9 Tabla de interpretación de las pruebas de confirmación.**

Reacciones Bioquímicas	Autoaglutinación	Reacciones Serológicas	Interpretación
Típicas	No	Antígenos O, Vi o H Positivo (y Vi positivo si es analizado)	Cepas deben ser consideradas como <i>Salmonella</i> .
Típicas	No	Antígenos O y/o H Negativos	<i>Salmonella</i> Presuntiva.
Típicas	Si	<b>No analizables</b> debido a reacción de autoaglutinación	
Reacciones Atípicas	—	—	No son consideradas como <i>Salmonella</i> .

**5.4 Expresión de los resultados.**

- Con la ayuda de las Tablas expresadas en el punto Cuadro Interpretación de las pruebas bioquímicas y Tabla de interpretación de las pruebas de confirmación, realizar la expresión de resultados.

Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella* y si las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente y monovalente son positivas, se informa como **"Presencia de *Salmonella* spp. Grupo"**.

Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella* y las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente, son negativas y positivas con el antisuero flagelar

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella spp.* según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

polivalente (H), se informa como **Presencia de *Salmonella spp.*** Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella*, pero la aglutinación con el antisuero polivalente somático ni flagelar ocurre, se deben realizar pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por el API 20 E. Si el resultado de estas pruebas es concordante con el género *Salmonella*, se informa como **Presencia de *Salmonella spp.***

- Si las reacciones bioquímicas no son típicas y si las pruebas de confirmación serológica somática y flagelar son negativas, se informa como **Ausencia de *Salmonella spp.***

Una vez que se haya seroagrupado la cepa y su resultado corresponda a los serogrupos B y D, el responsable técnico del Laboratorio Autorizado debe realizar el envío de éstas al Departamento Red SAG de Laboratorios.

Además, el laboratorio autorizado debe generar el protocolo de derivación de la cepa, seleccionando la técnica Serotipificación en el Sistema de Sanidad Animal (SSA). Acompañando la cepa y el RPOA se debe enviar adjunta la información de los resultados de las pruebas bioquímicas e identificándola con el número de muestra consignado en el Protocolo Oficial original.

Si la cepa diagnosticada corresponde a otro serogrupo, el responsable técnico del Laboratorio Autorizado, debe consultar al MVA responsable de la muestra, si el serogrupo diagnosticado ha sido detectado previamente en el sector de origen, durante el año/calendario en curso. El laboratorio autorizado debe recibir esa respuesta dentro de 72 horas.

Si el MVA informa que corresponde a un serogrupo nuevo para el sector muestreado, el Laboratorio Autorizado debe realizar la serotipificación de la cepa mediante metodología automatizada Check and Trace o equivalente (Luminex X MAP-R. *Salmonella* serotyping) y adicionalmente se debe enviar la cepa para confirmación al Departamento Red SAG de Laboratorios. (ver punto 9.2 del presente Instructivo técnico).

## **6 REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS.**

El ingreso de resultados lo realiza el Laboratorio autorizado en la plataforma en línea (SSA), <http://sanidadanimal.sag.gob.cl/>.

Los resultados serán validados y disponibles para los MVA, MVO, Laboratorio autorizado, Laboratorio Oficial SAG y División de Protección Pecuaria.

Cabe señalar que el laboratorio autorizado debe mantener una copia de los resultados para sus registros.

El laboratorio autorizado debe generar el protocolo de derivación de la cepa al Laboratorio oficial SAG, seleccionando la técnica **Serotipificación** en el Sistema de Sanidad Animal (SSA).

El laboratorio oficial SAG realizará la tipificación mediante metodología Kauffman White Le Minor a las cepas de *Salmonella spp.* despachadas e informará al laboratorio autorizado el resultado obtenido mediante el Sistema en línea (SSA).

**Instructivo Técnico de análisis para detección de  
*Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas,  
tórulas de arrastre o calzas**

**7 SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS.**

De conformidad con lo señalado en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, convenio de autorización y el presente Instructivo técnico, todo laboratorio autorizado deberá ser supervisado por el SAG, a través una visita de supervisión al año a las dependencias del laboratorio.

Una vez realizada la visita de supervisión, se generará un informe, el que indicará las no conformidades y observaciones encontradas, las que deben ser respondidas por el laboratorio autorizado en los plazos estipulados en dicho informe.

Estas acciones de supervisión, se efectuarán sin perjuicio de las facultades de fiscalización que tiene el Servicio.

En caso de detectarse no conformidades en el desempeño del tercero, el Servicio indicará en el informe de supervisión los puntos a subsanar y el plazo para ello. Posteriormente, el Servicio realizará una segunda supervisión, la cual podrá ser presencial o documental que tendrá como objetivo revisar que las observaciones fueron subsanadas y de mantenerse las no conformidades, se otorgará un último plazo para subsanarlas y el Servicio efectuará una tercera supervisión, con el objeto antes señalado, en caso de no haber corregido la totalidad de no conformidades detectadas, pasarán a considerarse un incumplimiento.

Por cada una de las supervisiones adicionales a la establecida en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, para verificar el cumplimiento de las no conformidades, el tercero deberá pagar la tarifa respectiva por cada una de ellas. A excepción de que la supervisión adicional sea por un objetivo distinto determinado por el Servicio.

En caso que los supervisores SAG detecten que las no conformidades e incluso los incumplimientos, se deben al actuar del Responsable Técnico, el Servicio podrá sugerir al autorizado, en el informe de supervisión, que postule a un nuevo Responsable Técnico

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias detecta faltas en el desempeño del laboratorio autorizado, que afecten negativamente el resultado del Programa Oficial asociado a su autorización, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al laboratorio autorizado el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización.

Lo anterior es sin perjuicio de la aplicación de una medida por incumplimiento según las causales establecidas en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, convenio de autorización y el Reglamento Específico correspondiente.

En caso de revocación, el autorizado afecto a tal medida, quedará inhabilitado para postular nuevamente a esta autorización, por el plazo de dos (2) años contados desde la fecha en que quede ejecutada la resolución que establece esta medida.

Los laboratorios deberán participar en programas de ensayos inter-laboratorios nacionales y/o internacionales, al menos una vez al año, cuyos resultados deberán ser remitidos al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de *Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas, tómulas de arrastre o calzas**

El laboratorio autorizado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales o internacionales, en el momento que el Servicio lo requiera.

## 8 OBLIGACIONES.

El laboratorio autorizado deberá cumplir con lo establecido en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, convenio de autorización, Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos y las siguientes obligaciones específicas del presente Instructivo técnico:

- Seguir los protocolos establecidos en los puntos 5 y 6 del presente Instructivo Técnico.
- El laboratorio autorizado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales o internacionales, en el momento que el Servicio lo requiera.
- Participar en programas de ensayos inter-laboratorios nacionales y/o internacionales, al menos una vez al año, cuyos resultados deberán ser remitidos al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias.

## 9 FORMULARIOS Y OTROS.

### 9.1 Formularios relacionados.

Código	Nombre
F-ATR-AAT-287	Lista de responsables técnicos y analista(s) del laboratorio vinculado al análisis para detección de <i>Salmonella</i> spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas, tómulas de arrastre o calzas.
F-GF-CGP-PT-068 o aquél que lo reemplace	Formulario solicitud de autorización de laboratorios de análisis/ensayo.
F-GF-CGP-PT-069 o aquél que lo reemplace	Formulario de identificación de responsable técnico.
F-ATR-AAT-312	Declaración jurada simple para personas naturales y jurídicas.
F-ATR-AAT-314	Formulario autorización para la publicación de datos de terceros autorizados por el SAG.

**Instructivo Técnico de análisis para detección de *Salmonella* spp. según ISO 6579- 1:2017/Amd.1:2020, en muestras de fecas, tómulas de arrastre o calzas**

**9.2 Diagrama de flujo para clasificación de un pabellón/sector positivo a *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Tiphymurium y *Salmonella* Tiphymurium monofásica.**

