

**Instructivo Técnico de Análisis para *Salmonella spp*
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR
BIO 12/16-09/05 y Confirmación según Norma ISO
6579-1:2017/Amd. 1:2020.**

Código: D-ATR-AAT-30
Versión: 02

**Instructivo Técnico de Análisis para *Salmonella spp* Mediante Método
Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 y Confirmación según
Norma ISO 6579-1:2017/Amd. 1:2020.**

Tabla de Contenidos

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1 OBJETIVOS Y ALCANCE.....	3
2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	3
3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	4
4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN	4
4.1. Requisitos del Personal.....	5
4.2. Requisitos de infraestructura, equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo6	6
4.3. REQUISITOS ESPECÍFICOS.	8
4.4. MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS.	9
4.4.1. Solicitud de autorización	9
Dossier Técnico (obligatorio):	10
5. Análisis/Ensayo.....	11
5.1. Captación y envío de la muestra	11
5.2. Recepción y manejo de la muestra.....	11
5.3. Metodología.	12
5.3.1. Preparación de la muestra y pre - enriquecimiento NO selectivo	12
5.3.2. Enriquecimiento selectivo.....	14
5.3.3. Realización del Test VIDAS® EASY SLM	14
5.3.4. Confirmación	17
5.3.5. Interpretación de las Pruebas Bioquímicas	20
5.3.6. Cuadro Interpretación de las Pruebas Bioquímicas.....	22
5.3.7. Confirmación basada en la identificación de antígenos somáticos (O) de Salmonella	23
5.3.8. Confirmación basada en la identificación de antígeno flagelar (H) de Salmonella	24
5.3.9. Tabla de Interpretación de las Pruebas de Confirmación.....	25
5.4. Expresión de los resultados.....	25
6. REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS	26
7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	26
8. OBLIGACIONES	28
9. FORMULARIO	28

1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este documento, es dar a conocer el procedimiento para que personas jurídicas accedan a la autorización y celebren convenios con el Servicio Agrícola y Ganadero, a objeto de realizar los análisis para ***Salmonella* Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 y Confirmación según Norma ISO 6579-1:2017/Amd. 1:2020** de conformidad con lo estipulado en el inciso tercero del artículo 1° del Decreto Ley N° 3.557 de 1980, y el Decreto Supremo N°3, de 1982, ambos del Ministerio de Agricultura.

En el presente documento, se describen los requisitos, condiciones y directrices técnicas que deben cumplir las personas jurídicas que postulen a la autorización y mantención que otorga el Servicio para la ejecución de este análisis. Del mismo modo, se estipulan las condiciones de funcionamiento que deben cumplir una vez obtenida la autorización.

El presente documento aplica en muestras de **piel de cuello de ave, enjuague de carcasa de aves, enjuague de partes de aves, esponjas de superficie de carcasas/hemicanales, productos picados/molidos de aves y producto terminado crudo de aves**, las cuales corresponden a muestreos microbiológicos oficiales tomados desde plantas de faena para carnes de exportación, incluidas dentro del Programa de Control Microbiológico Oficial.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Resolución N°3571 de 2020, que aprueba el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros Reglamento General Del Sistema De Autorización De Terceros o la que lo reemplace.
- Resolución Exenta N° 90 de 2014, del Servicio Agrícola y Ganadero. Aprueba el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo o la que lo reemplace.
- Documentos asociados al Programa de Control Microbiológico Oficial publicados en la página institucional del Servicio o emanados desde la División de Protección Pecuaria.
- Documento General "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación". SAG. Versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", versión vigente.
- 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.

- Norma ISO 6579-1:2017/Amd. 1:2020 o versión vigente "Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella". Part 1: Detection of Salmonella spp. o Norma Chilena equivalente, versión vigente.
- 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.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá, versión vigente.
- ISO 16140-3: 2021 "Microbiology of the food chain -Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory".
- Instructivo Técnico VIDAS® Salmonella SLM REF 30702. Biomerieux, versión vigente.
- Manual de uso Equipo VIDAS® o Mini VIDAS®, versión vigente.
- Manual de uso Equipo Heat&Go, versión vigente.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- Protocolo Oficial SAG: Documentos emitidos por profesionales del SAG: por ejemplo "Protocolo de Toma de Muestras y Resultados Laboratorio".
- SAG: Servicio Agrícola y Ganadero (o Servicio).
- MVO: Médico Veterinario Oficial del SAG.
- INN: Instituto Nacional de Normalización.
- ISO: International Organization of Standardization.
- NCh: Norma Chilena.
- SAC: Sistema de Aseguramiento de la Calidad.

4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN

Las personas jurídicas interesadas en postular a la autorización en esta área, deben cumplir con todo lo establecido tanto en el Reglamento General del Sistema nacional de

Autorización de Terceros, el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, el convenio de autorización y el presente instructivo.

4.1. Requisitos del Personal

El tercero autorizado, deberá contar con servicios permanentes de personal capacitado y competente para realizar el Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 para determinación de *Salmonella spp.* y Confirmación según Norma ISO 6579-1:2017/Amd. 1:2020 o versión vigente.

4.1.1 Responsable técnico:

El laboratorio debe contar con un responsable técnico, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado. Este cargo requiere un subrogante para períodos de ausencia del titular. Este responsable técnico y su subrogante, deben 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.
- Experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos (2) años, uno de ellos en análisis en el área de microbiología de alimentos.
- Haber recibido capacitación en la realización del **Instructivo técnico de análisis para *Salmonella* Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 y Confirmación según Norma ISO 6579-1:2017/Amd. 1:2020** o versión vigente en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la autorización, comprobable 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.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión de la calidad como en la/s metodología/s que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

4.1.2 Analista:

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

- Poseer un título profesional o técnico, de una carrera correspondiente al área biológica, o de microbiología de los alimentos, compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización, que haya sido impartida por una entidad de

enseñanza superior reconocida por el Estado o, en caso de título extranjero, revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.

- Haber recibido capacitación en la realización del **Instructivo técnico de análisis para *Salmonella* Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 y Confirmación según Norma ISO 6579-1:2017/Amd. 1:2020** o versión vigente en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la autorización, comprobable 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.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión de la calidad como en las metodologías que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

4.2. Requisitos de infraestructura, equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo

4.2.1. Infraestructura.

- Infraestructura y equipamiento básico requeridos para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, cumpliendo los requisitos señalados en los puntos correspondientes de la 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.

4.2.2. Equipos y materiales

- Balanza digital.
- Sistema automatizado VIDAS® o Mini VIDAS®
- Bloque calefactor VIDAS® Heat and Go (opcional al baño termoregulado a temperatura de ebullición, 95° a 100°C).
- Estufa de cultivo 37° ± 1°C.
- Estufa de cultivo 41,5° ± 1 °C.
- Baño de agua termoregulado a 47°-50°C y 95 a 100°C.
- Agitador de tubos o vórtex.
- Autoclave(s).
- Stomacher.
- Refrigerador 5°± 3°C.
- Congelador para mantención de cepas.
- Congelador para mantención de muestras recibidas congeladas.
- Gabinete de Bioseguridad clase II. Requerido en todas las etapas de análisis a excepción de la serología en placa.
- Gotarios estériles.

- Pipetas bacteriológicas estériles desechables de 1 y 5 ml o micropipetas.
- Guantes desechables.
- Asa de micrón de aro de 3 mm (10µl) y asa en punta (o desechables).
- Placas de vidrio para aglutinación.
- Lámpara o lupa con luz.
- Placas Petri plásticas desechables 90 mm o 140 mm.
- Tubos de ensayo.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Bolsas plásticas resellables, estériles para stomacher y/o Bolsas con filtro de plástico resellables estériles para stomacher.
- Frascos Schott o equivalentes.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras y pinzas.
- Mechero.

4.2.3. Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agua Peptonada Tamponada (APT). (ISO 6579:2017) En frasco Schott x 225 ml o en 1.625 ml, 50 ml y/o 30 ml (u otro volumen necesario para el análisis).
- Caldo SX2. Ref 42. 121. Biomerieux. Tubos tapa rosca x 10 ml.
- Caldo soya tripticasa o triptosa (CST).
- Kit VIDAS® Salmonella SLM fecha vigente.
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).
- Agar SM2 chromID Salmonella o agar cromogénico equivalente.
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA) o medio para la decarboxilación de L- Lisina (LDC).
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO) o Medio para la detección de Indol.
- Agar Tripticasa Soya (TSA) o Agar Nutritivo (AN).
- Antisuero Somático (O) Polivalente A – I o Poli A-I &Vi para *Salmonella spp*.
- Antisueros Somáticos (O) Monovalentes para *Salmonella spp*. (Grupos A – I & Vi).
- Antisuero Flagelar (H) Polivalente Z para *Salmonella spp*. o Test de Látex para *Salmonella spp*.
- API 20 E de Biomerieux u otro equivalente y reactivos correspondientes.
- Agua Clase 4.
- Solución de suero fisiológico al 0.85%.
- Solución de suero fisiológico al 0.85% con formalina al 0.6%.
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1% y al 10%.
- Discos ONPG (Opcional).
- Caldo Rappaport-Vassiliadis con soya (RVS).
- Caldo Soya Tripticasa (CST).
- Agar Urea de Christensen.
- Reactivo de Kovacs.

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

serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella spp.* - Amendment 1 Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC" y a la norma ISO 11133, versión vigente.

4.2.4. Estándares

Se utilizarán como estándares Cepas de colecciones reconocidas, ATCC o equivalente, una cepa de *Salmonella spp.* H₂S positiva, como control positivo y otra cepa como control negativo (a elección), las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma ISO 11133, versión vigente. No es posible utilizar cepas bacterianas consideradas exóticas para el país. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas de colecciones de referencia serán utilizadas para el control del método de ensayo. Además, pueden ser necesarias otras cepas de referencia 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 de referencia recomendadas por el fabricante o aquellos indicados en la ISO 11133, versión vigente.

4.3. REQUISITOS ESPECÍFICOS.

- Los laboratorios, deben contar con un sistema de aseguramiento de calidad implementado, siguiendo las directrices de la Norma ISO 17.025, versión vigente.
- El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión de la calidad 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 Norma ISO 17025, versión vigente, reconocida por la International Organization for Standardization.
- Una vez que el laboratorio solicitante obtenga la autorización de las técnicas por el SAG, o por otra entidad Internacional acreditadora para la Norma ISO 17.025, versión vigente, reconocida por la International Organization for Standardization, se le otorgará un plazo de 2 años para lograr la autorización de éstas ante el INN
- El Laboratorio deberá indicar su capacidad diagnóstica, señalando el número de muestras que ejecuta por análisis y cantidad de analistas competentes para este alcance.
- 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 y enviar los siguientes documentos:

- Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la autorización.

- Procedimiento e Instructivos de Preparación y control de Medios de Cultivo involucrados en el alcance de la autorización.
- Procedimiento /Instructivo Preparación y Esterilización de Material de Vidrio.
- Procedimiento /Instructivo Eliminación y Descontaminación de Residuos y Materiales.
- Procedimiento /Instructivo Aseo y Limpieza de Laboratorios.
- Procedimiento /Instructivo Control Biológico de Esterilidad en Autoclaves.
- Procedimiento /Instructivo de Verificación de Equipos.
- Procedimiento /Instructivo Control de Calidad Interno.
- Procedimiento /Instructivo Control de Ambiente.
- Procedimiento /Instructivo Manejo de Cepas Control.
- Procedimiento/Instructivo de identificación serológica de Salmonella.
- Lista Maestra de Equipos e Instrumentos de Medición, reactivos, material de referencia, etc. involucrados en el alcance de la autorización, de acuerdo a lo descrito en la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Programa de Mantenimiento / Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales.
- 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 postulante debe presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad implementado en el Laboratorio y que demuestre la acreditación en ISO 17025, versión vigente, 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:

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 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-XX de este Instructivo. 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.
- Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance de autorización.
- Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención, verificación y calibración de éstos.
- Lista de materiales, reactivos y Kits.

➤ Procedimientos y/o Instructivos específicos e informes de verificación de método y de competencia técnica del personal, señalados en el numeral 4.1 y 4.3 de este Instructivo.

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 Técnico, serán confirmados por el SAG durante 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, su subrogante y a los analistas identificados como postulantes a la autorización, a una evaluación teórica y/o práctica, según se estime necesario.

El Dossier Técnico presentado para la postulación debe incluir toda la información solicitada en los numerales 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4 del presente Instructivo. La falta de algún documento, ocasionará el rechazo de la postulación.

5. ANÁLISIS/ENSAYO

5.1. Captación y envío de la muestra

La captación 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.**

La toma y envío de muestras, deben ser realizadas por el Médico Veterinario Oficial del SAG (MVO), el cual debe adjuntar las muestras a un Protocolo Oficial SAG, en cuyo documento se debe señalar la identificación de cada una de ellas, el tipo de muestras, la fecha y la hora de la recolección de éstas y cualquier otra información que se solicite en dicho Protocolo. Lo anterior, debe realizarse de acuerdo a lo definido en el Documento General "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación" emitido por el SAG, última versión vigente.

5.2. Recepción y manejo de la muestra.

La recepción y manejo de las muestras en el laboratorio debe realizarse de acuerdo a lo señalado en el Documento General "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación" emitido por el SAG, versión vigente u otra directriz entregada por el Nivel Central del SAG a través de vías oficiales (Circulares, Hojas de Envío, etc.). Cabe señalar, la importancia de verificar los siguientes puntos:

- ✓ Temperatura de las muestras al momento de recepción: Rango aceptado: 2° a 8 °C para muestras refrigeradas y -22 a -12°C para muestras congeladas.
- ✓ Tiempo entre la toma de muestras y la recepción en el laboratorio no superior a 36 horas, ya que deben ser procesadas a la brevedad una vez recibidas en el laboratorio.

- ✓ Integridad de las muestras y los envases que las contienen.
- ✓ Cantidad suficiente de muestra para el análisis.
- ✓ Identificación adecuada.
- ✓ Contenedor limpio y con sello SAG intacto.
- ✓ 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.
- ✓ Protocolo fuera del contenedor y con los datos requeridos de acuerdo al Documento General anteriormente mencionado.

5.3. Metodología.

5.3.1. Preparación de la muestra y pre - enriquecimiento NO selectivo

- **Método de esponja sobre carcasa (especies detalladas en el Manual del SAG señalado en las referencias)**

- La muestra de esponja debe ser recibida dentro de una bolsa plástica resellable estéril, previamente humedecida en 10 ml de Agua Peptonada Tamponada (APT).

Luego, se deben adicionar 50 ± 1 ml de APT, completando un volumen total de 60 ml. El APT antes del uso, debe haber alcanzado la temperatura ambiente Posteriormente, homogeneizar la muestra apretando la esponja desde el exterior de la bolsa con las manos.

- Incubar el caldo de pre - enriquecimiento (APT) a $37 \pm 1^\circ$ C durante 16 - 22 horas.
- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

- **Enjuague de carcasa y enjuague de partes (especies detalladas en Documentos SAG señalados en las referencias):**

- La muestra de lavado de carcasa o de enjuague de partes debe ser recibida en un frasco que contenga 30 ml de agua de enjuague. Deben utilizarse frascos **diferentes** para cada análisis de *Salmonella spp* y *E. coli*.

- Traspasar los 30 ml del enjuague a una bolsa de plástico estéril y adicionarle 30 ± 0.6 ml de APT completando un volumen final de 60 ml. El APT antes del uso, debe haber alcanzado la temperatura ambiente. Luego, homogenizar en stomacher aproximadamente por 2 minutos o agitar fuertemente.

- Incubar el caldo de pre - enriquecimiento (APT) a $37 \pm 1^\circ$ C durante 16 - 22 horas.
- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

- **Piel cuello de ave y productos terminados de ave:**

- El día de procesamiento de las muestras, se coloca la balanza digital en el interior del gabinete de bioseguridad. Luego mediante el uso de utensilios estériles, se pesan 25 ± 0.5 g de la muestra a analizar, la cual se introduce al interior de una bolsa plástica estéril de stomacher.
- Si la muestra de producto terminado se recibe congelada, se debe permitir su descongelamiento a temperatura ambiente, previo al pesaje de la muestra para su análisis.
- Posteriormente se adiciona a la bolsa que contiene la muestra, 225 ml de Agua Peptonada Tamponada (APT). El APT antes del uso, debe haber alcanzado la temperatura ambiente. Luego, todo el contenido de la bolsa se homogeniza en el stomacher por 2 minutos a velocidad media.
- Incubar el caldo de pre – enriquecimiento (APT) a $37 \pm 1^\circ$ C durante 16 – 22 horas.
- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

- **Productos picados/molidos de ave.**

- El día de procesamiento de las muestras, se coloca la balanza digital en el interior del gabinete de bioseguridad. Luego mediante el uso de utensilios estériles, se pesan 325 ± 32.5 g de la muestra a analizar, la cual se introduce al interior de una bolsa plástica estéril de stomacher.
- Posteriormente se adiciona a la bolsa que contiene la muestra, $1.625 \pm 32,5$ ml de Agua Peptonada Tamponada (APT). El APT antes del uso, debe haber alcanzado la temperatura ambiente. Luego, todo el contenido de la bolsa se homogeniza en el stomacher por 2 minutos a velocidad media. Si el volumen en la bolsa impide su homogenización con el stomacher, vacíe sólo una fracción de los 1.625 ml de APT sobre los 325 g de muestra, proceda a homogenizar en stomacher y luego adicione el resto de APT.
- Incubar el caldo de pre – enriquecimiento (APT) a $37 \pm 1^\circ$ C durante 16 – 22 horas.
- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

NOTA: Luego de procesar las muestras, continuar con la siembra en caldo de pre-enriquecimiento de las cepas controles (*Salmonella spp.* H₂S positiva, como control positivo y otra cepa como control negativo), ambas en recipientes separados (bolsas o tubos estériles).

5.3.2. Enriquecimiento selectivo

- Transferir 0.1 ± 0.02 ml desde la bolsa con APT con la muestra incubada, a un tubo con 10 ml de Caldo SX2. Ref. 42. 121. Biomerieux. Tubos tapa rosca x 10 ml.
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles positivo y negativo, ambas en cada tubo de enriquecimiento respectivo.
- Incubar a $41.5 \pm 1^\circ$ C durante 22 – 26 horas.

5.3.3. Realización del Test VIDAS® EASY SLM

Para instrucciones completas del uso del equipo, referirse al Manual de Utilización del VIDAS® o del Mini VIDAS®.

5.3.3.1 Introducción de los datos de referencia.

Cuando se abra un **nuevo lote**, las especificaciones (o datos de la curva base de calibración) deben ser introducidos en el sistema (VIDAS® o Mini VIDAS®) con la ayuda de la tarjeta de lote patrón MLE (ficha de especificaciones) incluida en cada caja. Si esta operación no se efectúa antes de comenzar los tests, el sistema no podrá editar los resultados. Estas especificaciones se introducen sólo una vez para cada lote.

Es posible introducir las especificaciones de forma automática por la lectura del código de barras impreso en la etiqueta de la caja del lote a usar (ver instrucciones del fabricante).

5.3.3.2 Calibración

La calibración, utilizando el estándar suministrado en la caja, debe efectuarse con cada nuevo lote que se abra, después de introducir las especificaciones del lote patrón. Se debe efectuar una recalibración cada 14 días.

Esta operación permite ajustar la curva de calibración a cada aparato y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo.

El estándar, identificado por S1, será analizado por duplicado (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV ("Relative Fluorescent Value") fijados. Si no es así, la media no será memorizada: Repetir una calibración.

5.3.3.3 Realización del test

- a) Sacar únicamente los reactivos necesarios, dejarlos 30 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización.

**Instructivo Técnico de Análisis para *Salmonella spp*
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR
BIO 12/16-09/05 y Confirmación según Norma ISO
6579-1:2017/Amd. 1:2020.**

Código: D-ATR-AAT-30
Versión: 02

b) Utilizar un cartucho "SLM" y un "cono SLM" para cada muestra, control o estándar a analizar. Verificar que la bolsa de conos ha sido bien cerrada después de cada utilización.

c) Teclear o seleccionar "SLM" sobre el sistema para introducir el código del test. El estándar identificado obligatoriamente por "S1", debe analizarse por duplicado. Si el control positivo tiene que analizarse, se identificará por "C1" y si tiene que analizarse el control negativo, se identificará por "C2".

d) Homogeneizar bien el estándar, los controles y las muestras a analizar, con un mezclador tipo vórtex.

e) Es indispensable inactivar las muestras al Baño-María o bloque calefactor VIDAS Heat & Go durante 15 minutos antes de realizar el test VIDAS® EASY SLM.

Transferir 1-2ml del caldo SX2 incubado a un tubo. Esto se realiza para cada muestra y para un control positivo de Salmonella. Cierre el tubo. Hierva durante 15 ± 1 minutos a $95 - 100^\circ \text{C}$. Enfríe el tubo. Agite el caldo hervido y transfiera 0,5 ml al pocillo de la muestra del cartucho VIDAS®.

Si usa el bloque calefactor VIDAS® Heat & Go, transferir 0.5 ml del caldo SX2 al pocillo de las muestras del cartucho VIDAS®. Caliente durante 15 ± 1 minutos, quite el cartucho del bloque, deje enfriar durante 10 minutos.

f) Mantenga el caldo SX2 sin inactivar a $2-8^\circ \text{C}$ por si fuera necesario llevar a cabo una confirmación.

Nota: El Caldo SX2 no hervido/calentado puede conservarse durante 72 horas a $2-8^\circ \text{C}$. El test VIDAS® y la confirmación de resultados positivos debe realizarse dentro de las 72 horas siguientes a la finalización de la incubación del caldo selectivo a $41.5 \pm 1^\circ \text{C}$.

g) Coloque los pocillos y los conos en el equipo VIDAS® siguiendo el orden de identificación creado en la pantalla del equipo.

h) Efectúe el test VIDAS® de acuerdo a las indicaciones de operación del equipo de acuerdo a instrucciones del fabricante.

i) Conserve el registro de resultados del equipo.

j) Todos los resultados positivos deben ser confirmados a partir del caldo SX2.

k) Dispensar 500 μl de estándar, muestra y controles en el pocillo de muestra del cartucho.

l) Colocar en el sistema los conos y los cartuchos. Verificar bien la concordancia de los códigos (colores y letras) entre el cono y el cartucho.

m) Lanzar el análisis (ver Manual de Utilización). Todas las etapas están controladas automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en aproximadamente 45 minutos.

n) Al finalizar el análisis, retirar los conos y los cartuchos del sistema utilizando guantes estériles desechables.

o) Eliminar los conos y cartuchos utilizados en un recipiente apropiado, resguardando las normas de bioseguridad.

5.3.3.4 Resultados e Interpretación

- Una vez finalizado el test, los resultados son analizados automáticamente por el sistema.
- El equipo efectúa dos medidas de fluorescencia en la cubeta de lectura para cada muestra analizada.
- La primera lectura mide el ruido de fondo de la cubeta de substrato antes de ponerse en contacto con el cono.
- La segunda lectura se efectúa después de la incubación del substrato con la enzima del interior del cono.
- El RFV (Relative Fluorese Value) se calcula mediante la diferencia entre la lectura del ruido de fondo y la lectura del resultado final. Este cálculo aparece en la hoja de resultados.
- El RFV obtenido para cada muestra es interpretado por el sistema VIDAS® de la siguiente manera:

$$\text{Valor del test} = \frac{\text{RFV muestra}}{\text{RFV estándar}}$$

Umbral e interpretación de los resultados:

Valor del test	Interpretación
< 0.23	Negativo
≥ 0.23	Positivo

- Se imprime una hoja de resultados sobre la cual figuran:
 - El tipo de ensayo realizado.
 - La identificación de la muestra.
 - La fecha y la hora.
 - El número de lote y fecha de caducidad del kit.
 - El RFV, el valor del test y el resultado con su interpretación para cada muestra.

- Un resultado con un valor de test inferior al umbral indica que la muestra no contiene antígenos de *Salmonella*, o contiene antígenos de *Salmonella* en una concentración por debajo del umbral de detección.
- Un resultado con un valor del test superior o igual al valor umbral indica que la muestra contiene antígenos de *Salmonella*.
- Todos los resultados positivos emitidos por el test VIDAS®, se consideran como **presuntivos** y deben ser confirmados por el método tradicional de cultivo, de acuerdo a lo señalado en el punto 5.3.4.
- Los **resultados no válidos** pueden aparecer cuando:
 - La lectura del ruido de fondo es superior a un umbral predeterminado (indicando una contaminación del sustrato). En este caso, repetir el ensayo con la muestra inactivada o el reactivo en cuestión (S1, C1 o C2). Ver el manual del usuario para información complementaria.

5.3.3.5 Control de Calidad

- Un control positivo y un control negativo se incluyen en cada caja de reactivos VIDAS® Salmonella.
- Los controles deben ser analizados inmediatamente después de la apertura de una nueva caja, con el fin de garantizar la ausencia de alteración de los reactivos.
- También resulta necesario comprobar cada calibración mediante el uso de estos controles. El equipo sólo podrá comprobar los valores de control identificados con C1 y C2.
- **No se podrán validar los resultados si los valores de control desvían de los valores esperados.**

Nota:

Es responsabilidad del usuario garantizar que el control de calidad se realiza conforme a la legislación local en vigor.

5.3.4. Confirmación

La confirmación podrá realizarse a partir de los tubos SX2 hasta 72 horas del término de su incubación si son mantenidos entre 2 a 8 °C.

Deben confirmarse todos los resultados positivos obtenidos con el VIDAS® EASY Salmonella.

5.3.4.1. Aislamiento en agar selectivo

- Agitar los tubos de SX2, utilizando el agitador o Vórtex.

- Introducir el asa de aro en el interior del tubo SX2 y con abundante inóculo, sembrar por agotamiento sobre Agar SM2 chromID Salmonella y un agar selectivo complementario.
- No subdividir las placas. Identificar las placas sembradas.
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles positivo y negativo, ambas en el medio de agar selectivo.
- Incubar las placas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ o de acuerdo a la información del fabricante del medio SM2 y para XLD incubar a 34°C a 38°C por 24 ± 3 horas.
- Examinar las placas dentro de 18 a 24 hrs., con el propósito de observar la presencia de colonias típicas de *Salmonella spp* y de colonias atípicas que podrían ser *Salmonella spp*,
- **SM2 chromID Salmonella:** colonias rosadas a malva, de apariencia lisa y de bordes netos.
- **Agar XLD:** colonias negras o rojas con o sin centro negro. El borde o margen de la colonia podría permanecer amarillo dentro de las 24 horas, posteriormente debería virar a rojo.
- Almacenar, bajo refrigeración todas las placas desde donde se seleccionaron colonias. Si el resultado de las colonias sospechosas es negativo, y si es apropiado, repicar nuevamente colonias desde las placas refrigeradas para una nueva confirmación.
- El Analista debe registrar estos resultados en la Planilla de trabajo correspondiente, de acuerdo a la elaborada por cada laboratorio autorizado para este fin.

NOTA: El reconocimiento de colonias de *Salmonella spp.* se adquiere con la experiencia, ya que su apariencia puede variar, no sólo según la serovariedad que sea, sino que además de acuerdo al batch de medio de cultivo selectivo utilizado.

- En caso de obtener resultados discordantes, se recomienda seguir los siguientes protocolos adicionales:

-Transferir 0,1 ml de caldo SX2 en 10 ml de caldo RVS.

-Tras una incubación de 18 a 20 horas a $41,5 \pm 1^\circ \text{C}$ aislar sobre agares selectivos.

5.3.4.2. Selección de colonias para Pruebas Bioquímicas.

- Seleccionar 1 a 5 colonias de acuerdo a la presentación característica de *Salmonella spp.* en cada agar.
- 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

**Instructivo Técnico de Análisis para *Salmonella spp*
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR
BIO 12/16-09/05 y Confirmación según Norma ISO
6579-1:2017/Amd. 1:2020.**

Código: D-ATR-AAT-30
Versión: 02

selectivo y agares selectivos. Marcar las colonias sospechosas seleccionadas en cada placa.

- Estriar las colonias seleccionadas en la superficie de placas de TSA o AN previamente secadas, de manera que se permita el desarrollo de colonias aisladas. Incubar las placas inoculadas entre 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 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. Si no se obtienen cultivos puros, re-aislar hasta conseguirlo.

- Inocular cada una de las colonias seleccionadas en los medios TSI, LIA (o LDC), MIO (o medio para reacción de Indol), Agar Urea y ONPG (este último opcional).

- 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, inocular el tubo de agar LIA, pinchando dos veces en profundidad y hacer estría en superficie. Luego inocular el MIO en picadura y en Agar UREA por estría en superficie. Inocular además dos tubos de agar TSA en estría en la superficie e incubar entre 34°C a 38°C por 24 ± 3 horas. Uno de los tubos de agar TSA se ocupa para realizar la confirmación serológica somática y el otro se debe mantener en refrigeración para ser enviado, en caso de ser necesario, para realizar la tipificación de la cepa.

- En caso de realizar la prueba de detección de β galactosidasa utilizar discos ONPG, siguiendo las instrucciones del fabricante.

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

- Incubar todos los medios utilizados para la batería bioquímica a 34°C a 38°C por 24 ± 3 horas. (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*.

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

NOTA: En caso de obtener resultados discordantes, se recomienda seguir los siguientes protocolos adicionales:

- Transferir 0,1 ml de caldo SX2 (no calentado/hervido) en 10 ml de caldo RVS.

- El Analista debe registrar estos resultados en la Planilla de trabajo correspondiente, de acuerdo a la elaborada por cada laboratorio autorizado para este fin.

5.3.5. Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

a) 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 H₂S (Sulfuro de Hidrógeno):
 - Produce H₂S: 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).

Nota: 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 Hidrógenos (H₂S), que ennegrece el agar.

Cuando la *Salmonella* es Lactosa positiva, el tendido del TSI es de color amarillo.

b) 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 H₂S
 - Produce H₂S: Ennegrecimiento del medio intensidad variable).
 - No produce H₂S: 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).

c) Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).

- **Movilidad**
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.
- **Descarboxilación de la Ornitina**
Descarboxila la ornitina: Coloración azul, de intensidad variable.
No descarboxila la Ornitina: Coloración amarilla.

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

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

d) Actividad Ureasa

- Si la reacción es positiva se libera amonio desde la Urea, con lo cual cambia de color del indicador (Rojo Fenol) desde un color rosa a un fucsia 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.

e) Detección de β Galactosidasa (Opcional)

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

Nota: La mayor parte de las *Salmonella* típicas dan una reacción negativa a β -Galactosidasa (sin color).

Sin embargo, la *Salmonella entérica* subespecie *arizonae* y *diarizonae* y otros miembros de la Familia Enterobacteriaceae, presentan una reacción positiva a β -Galactosidasa (color amarillo).

5.3.6. Cuadro Interpretación de las Pruebas Bioquímicas.

Agar TSI			Agar LIA			Agar MIO			Agar Urea	ONPG	Microorganismo
Tendido / Fondo	GAS	H ₂ S	Tendido / Fondo	GAS	H ₂ S	Mov	Indol	Ornitina			
K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	-	-	<i>Salmonella</i> subespecie I Otras <i>Salmonella</i>
K/A	-	-	K/K	+	-	+	-	+	-	-	<i>S. Choleraesuis</i> Otras <i>Salmonella</i>
K/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	-	-	<i>Salmonella Typhi</i>
K/A	+	-	K/A	+	-	+	-	+	-	-	<i>Salmonella 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 spp.</i> <i>Citrobacter 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*

- Se someten a confirmación serológica todas las colonias que cumplan con las pruebas bioquímicas características para el género *Salmonella spp.*, de acuerdo a lo descrito en Punto 5.3.5. y 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 1 a 5 ml de solución salina al 0.85%. De tal manera de obtener una suspensión densa. Se sugiere una suspensión con turbidez 3 McFarland.
- 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 precaución dispensar siempre el antisuero antes de la suspensión del cultivo bacteriano, para evitar contaminación de los antisueros utilizados. 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.
- 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.
- El Analista debe registrar estos resultados en la Planilla de trabajo correspondiente, de acuerdo a la elaborada por cada laboratorio autorizado para este fin.

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 $35^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 18 a 20 horas o hasta que el desarrollo bacteriano alcance una densidad aproximada de 3 en la escala de McFarland.
- Adicionar al CTS inoculado, 5 ml de solución salina que contenga 0.6% de formalina y dejar reposar 1 hora. En dos tubos distribuir 1 ml de esta preparación (colocar 0.5 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.
- 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 del tubo utilizado como control 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.
- En el tubo de prueba observe 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 Aglutinación en Látex para *Salmonella* de Oxoid o equivalente (seguir las instrucciones del fabricante).
- El Analista debe registrar la presencia o ausencia de aglutinación en la Planilla de trabajo correspondiente, de acuerdo a la elaborada por cada laboratorio autorizado para este fin.

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 y H Positivos (y Vi positivo, si es analizado)	Cepas deben ser consideradas como <i>Salmonella</i> .
Típicas	No	Antígenos O y/o H Negativos	Salmonella Presuntiva
Típicas	Si	No analizadas 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 5.3.6. y 5.3.9., realizar la expresión de resultados.
- **Se deberá informar la detección o no de *Salmonella*, de acuerdo a la porción del test (ml, gramo, etc.) o superficie de área (cm², etc).**

- Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella spp.* y las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente y monovalente son positivas, se informa como **Presencia de *Salmonella spp.* Grupo “ ”, de acuerdo a la porción del test analizada.**
- Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella spp* y las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente son negativas y positivas con el antisuero flagelar polivalente (H), se informa como **Presencia de “*Salmonella spp.* no A - I”, de acuerdo a la porción del test analizada.**
- Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella spp*, 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 de Biomerieux. Si el resultado de estas pruebas es positivo, se informa como **Presencia de “*Salmonella spp.* no A - I”, de acuerdo a la porción del test analizada.**
- 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.*, de acuerdo a la porción del test analizada.**
- Una vez que se haya seroagrupado la cepa, es necesario mantener una alícuota viable a fin de posibilitar una posterior identificación de serotipo.

6. REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS

- Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del SAG, el cual debe contener la firma, timbre y nombre del responsable del laboratorio.
- El responsable del laboratorio debe enviar los resultados en el Protocolo Oficial del SAG al MVO, este último, una vez que verifique los datos remitidos en el protocolo, despachará los resultados, de acuerdo a lo señalado en el Documento General “Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación”.
- Los primeros días del mes, los laboratorios autorizados deberán enviar un resumen de las cepas aisladas durante el mes anterior. Los datos a incluir son: fecha de ingreso de la muestra, fecha de despacho del resultado, número de protocolo, número de la muestra, tipo de muestra, especie animal y serogrupo de *Salmonella*. El envío de los datos debe ser en una planilla Excel a los correos: yiviana.toledo@sag.gob.cl; irma.acevedo@sag.gob.cl ó amelia.morales@sag.gob.cl.

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 en las dependencias del laboratorio.

**Instructivo Técnico de Análisis para *Salmonella spp*
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR
BIO 12/16-09/05 y Confirmación según Norma ISO
6579-1:2017/Amd. 1:2020.**

Código: D-ATR-AAT-30
Versión: 02

- 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.
- Como se indicó anteriormente, el informe describirá las no conformidades u observaciones, las cuales deberán ser respondidos por el Laboratorio Autorizado, en un plazo no superior a 10 días hábiles. Posteriormente, al recibir esta respuesta, el Servicio realizará una revisión documental de éstas, pudiendo solicitar más antecedentes, si así lo requiere, por las vías institucionales de comunicación disponibles. Luego de ello, se efectuará una segunda revisión, si así se requiere,
- Si después de esta revisión, existieran no conformidades críticas que no puedan ser subsanadas, por parte del Laboratorio Autorizado, 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, en las que el personal del SAG deba ir a las dependencias del laboratorio, 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 RED SAG de Laboratorios 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, el SAG podrá instruir al Laboratorio Autorizado mediante una carta suscrita por el/la Jefe (a) del Departamento de Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros, 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 o revocación de la resolución, según las causales establecidas en la resolución 3571 de 2021, 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.
- La renovación de la autorización quedará supeditada a la emisión de un informe realizado por el Departamento RED SAG de Laboratorios, que indique que el Laboratorio

**Instructivo Técnico de Análisis para *Salmonella spp*
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR
BIO 12/16-09/05 y Confirmación según Norma ISO
6579-1:2017/Amd. 1:2020.**

Código: D-ATR-AAT-30
Versión: 02

Autorizado no posee No Conformidades que afectan el desempeño, conforme a las especificaciones contenidas en el presente Instructivo Técnico y Reglamento Específico para la Autorización de laboratorios de Análisis/ensayo.

- Los laboratorios deberán participar en programas de ensayos interlaboratorios nacionales y/o internacionales que incorporen el análisis del alcance, al menos una vez al año, cuyos resultados deberán ser remitidos al Departamento RED SAG de Laboratorios.
- El laboratorio autorizado deberá estar dispuesto a recibir supervisiones nacionales y/o internacionales, en el momento que el SAG lo requiera.

8. OBLIGACIONES

El tercero Autorizado deberá cumplir con lo establecido en el Reglamento General, 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 4, 5, 6 y 7 del presente Instructivo Técnico.

9. FORMULARIO

Código	Nombre
F-ATR-AAT-263	Lista de responsables técnicos y analista(s) del laboratorio vinculado al análisis

Lista De Responsables Técnicos y Analista(s) Del Laboratorio Vinculado al Análisis

Código: F-ATR-AAT-263
Versión: 01

Identificación del Laboratorio

Razón Social:

RUT:

Nombre completo	Cargo que desempeña. Responsable técnico y subrogante (RT) o analista (A)*	Nº Cédula identidad	Firma	Técnicas autorizadas

Este anexo debe ser actualizado cada vez que hay modificaciones del personal involucrado en el proceso de autorización, se debe considerar los subrogantes.

Firma del Representante Legal

Fecha: ____/____/____