

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE
SALMONELLA SPP. SEGÚN ISO 6579:2002(E)**

Código: D-GF-CGP-PT-029
Versión:01

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE
Salmonella spp. SEGÚN ISO 6579:2002(E)**

Contenidos

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 de infraestructura, equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo	4
4.1.1. Infraestructura	4
4.1.2. Equipos y materiales	5
4.1.3. Reactivos, soluciones y medios de cultivo	5
4.1.4. Estándares	6
4.2 Requisitos del personal	6
4.3 Requisitos Específicos	7
4.4. Medios de verificación de requisitos	8
4.4.1. Solicitud de autorización	8
5. ANÁLISIS/ENSAYO	9
5.1. Captación y envío de la muestra	9
5.2. Recepción y manejo de la muestra	9
5.3 Metodología	10
5.4. Expresión de los resultados	16
6. REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS	17
7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	17
8. MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO	17
9. ANEXOS	18

1. OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de éste 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/ensayo para el la **Detección de *Salmonella spp. según ISO 6579:2002(E)*** o versión vigente, 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 postulan a la autorización y mantención que otorga el Servicio para la ejecución de éste 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 y esponjas de superficie de carcasas/hemicanales**, las cuales corresponden a muestreos microbiológicos oficiales tomados desde plantas de faena para carnes de exportación, incluidas dentro del Programa Reducción de Patógenos.

2. REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Ley 18.755. Establece normas sobre organización y atribuciones del Servicio Agrícola y Ganadero.
- D.L. N° 3.557 de 1980, del Ministerio de Agricultura. Establece disposiciones sobre Protección Agrícola.
- D.S. N° 3 de 1982, del Ministerio de Agricultura. Establece requisitos para ejecutar labores de muestreo y análisis de plaguicidas y fertilizantes bajo convenio.
- Resolución Exenta N° 529 de 2012, del Servicio Agrícola y Ganadero. Norma el Sistema Nacional de Autorización de Terceros.
- Resolución Exenta N° 90 de 2014, del Servicio Agrícola y Ganadero. Aprueba el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo.
- Documento General "Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras 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 01. 97. Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones - Parte 1: Análisis físico-químicos y microbiológicos en procesos industriales

- Norma ISO 6579:2002. "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella spp*".
- ISO 11133:2014 "Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media".
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Reglamento específico para la Autorización de Laboratorios Análisis/Ensayo. versión vigente
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá, versión vigente.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

SAG:	Servicio Agrícola y Ganadero
MVO:	Médico Veterinario Oficial del SAG.
INN:	Instituto Nacional de Normalización.
ISO:	International Organization for 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 Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo como lo definido en el presente instructivo.

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

4.1.1. Infraestructura

- Infraestructura requerida para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, 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 habilitación, 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.

4.1.2. Equipos y materiales

- Estufa de cultivo $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo $41.5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Baño de agua termoregulado $48^{\circ}\text{-}50^{\circ}\text{C}$.
- Agitador de tubos o Vortex.
- Autoclave.
- Stomacher.
- Refrigerador y congelador.
- Lámpara o lupa con luz.
- Gabinete de Bioseguridad Clase II.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras y pinzas.
- Tubos de ensayo tapa rosca.
- Guantes desechables estériles.
- Gotarios estériles.
- Placas Petri plásticas desechables estériles. Tamaño pequeño (90 a 100 mm de diámetro) o tamaño grande (140 mm de diámetro).
- Pipetas bacteriológicas desechables 1 y 5 ml.
- Propipetas.
- Bolsas plásticas resellables estériles para Stomacher.
- Frascos Schott.
- Asa de nicrom de aro y asa en punta(o desechables).
- Placas de vidrio para aglutinación.
- Toalla de papel absorbente.

4.1.3. Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agua Peptonada Tamponada (APT) ISO 6579. Tubos 9 ml. Frasco Schott x 225 ml (u otro volumen necesario para análisis).
- Caldo Rappaport-Vassiliadis con soya (RVS). Tubos tapa rosca x 10 ml.
- Caldo Tetrionato Muller- Kauffmann con Novobiocina (TTMKn). Tubos tapa rosca x 10 ml.
- Solución de Yodina.
- Agar Verde Brillante (BGA) u otro equivalente como medio secundario y complementario al Agar XLD.
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).
- Agar Urea.
- Discos ONPG.
- Caldo RM-VP.
- Agar Tripticasa Soya. (TSA) o Agar Nutritivo (AN).
- Antisueros Somáticos (O) Polivalentes (al menos grupos A-I) para *Salmonella spp*.
- Antisueros Somáticos (O) Monovalentes (al menos Grupos A-I y Vi si es necesario) para *Salmonella spp*.

- Antisuero Flagelar (H) Polivalente para *Salmonella spp.* o Test de Látex para *Salmonella spp.*
- API 20 E de Biomerieux u otro equivalente y reactivos correspondientes.
- Solución de suero fisiológico al 0.85%.
- Solución de suero fisiológico al 0.85% con formalina al 0.6%.
- Solución de Yodina.
- Agua para análisis microbiológicos (clase 4).
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1%.
- Reactivo de Kovacs.

NOTA: La preparación de los medios de cultivo mencionados anteriormente debe ser de acuerdo a lo señalado en ISO 6579:2002, Microbiology of Food and animal feeding stuffs-Horizontal Method for Detection of *Salmonella spp.*

4.1.4. Estándares

Se utilizarán como estándares Cepas ATCC de una *Salmonella spp.* H₂S negativa y otra H₂S positiva, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726 y/o ISO 1113:2014. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas de colecciones de referencia, serán utilizadas para el control del método de ensayo. Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse como controles positivos y negativos las cepas ATCC recomendadas por el fabricante.

4.2 Requisitos del 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 y deberá contar con servicios permanentes de profesionales capacitados y competentes para la Detección de *Salmonella spp.* según ISO 6579:2002(E).

a) Responsable técnico:

Según se indica en el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios análisis/ensayo (Numeral 4.2), 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 responsable técnico, debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Poseer título profesional otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera del área Biológica de al menos ocho semestres académicos. 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 el área de bacteriología.
- Haber recibido capacitación en la realización de la Detección de *Salmonella spp.* según ISO 6579:2002(E), 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.

- El responsable técnico debe tener un subrogante, el que deberá cumplir los mismos requisitos indicados en el punto anteriormente descrito.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en la/s metodología/s que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

b) 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 Detección de *Salmonella spp.* según ISO 6579:2002(E), en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la autorización comprobable mediante certificado correspondiente.
- Estar calificado y 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.

4.3 Requisitos Específicos

- Los laboratorios, deben contar con un sistema de aseguramiento de calidad implementado y su respectivo manual de aseguramiento de la calidad, siguiendo las directrices de la Norma ISO 17.025.
- El Laboratorio debe poseer 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.
- Una vez que el laboratorio solicitante obtenga la autorización de las técnicas por el SAG, 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.

- El Laboratorio debe contar y enviar los siguientes documentos:
 - Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la autorización.
 - Procedimiento e Instructivos Preparación 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 Material de Lavado.
 - Procedimiento /Instructivo Control de Calidad Interno.
 - Procedimiento /Instructivo Control de Ambiente.
 - Procedimiento /Instructivo Manejo de Cepas Control.
 - Lista Maestra de Equipos e Instrumentos de Medición involucrados en el alcance de la autorización.
 - 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.

El cumplimiento de estos requisitos será confirmado por el Servicio 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.

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de autorización, además de los antecedentes establecidos en el numeral 6.1 del 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:

- Documentación que demuestre la capacitación y competencia técnica del responsable técnico identificado y de los analistas involucrados en la técnica del alcance de autorización, según lo descrito en el numeral 4.2 de este instructivo.
- Lista de los analistas vinculados a la técnica, de acuerdo al formato indicado en el Anexo Nº 9.1 de este Instructivo. Este listado debe incluir a los analistas participantes en el análisis/ensayo.
- Currículo del Responsable Técnico y de los analistas, involucrados en el alcance de autorización.
- Certificado de título del Responsable técnico y de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP. SEGÚN ISO 6579:2002(E)

Código: D-GF-CGP-PT-029
Versión:01

- Copia del manual de aseguramiento de la calidad del laboratorio.
- Organigrama de personal, indicando los nombres, profesión y cargos del responsable técnico 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.
- Plano o 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 y calibración de estos.
- Lista de materiales, reactivos y Kits.
- Instructivos específicos, señalados en el numeral 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 éste Instructivo Técnico, serán confirmados por el Servicio Agrícola y Ganadero en la visita de verificación, 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, según se estime necesario.

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 debe señalar la identificación de cada una de ellas, el tipo de muestras, la fecha y la hora de la recolección de éstas. Lo anterior, debe realizarse de acuerdo a lo definido en el Documento General "Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras de exportación". 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 "Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras de exportación". SAG. Versión vigente. Cabe señalar, la importancia de verificar los siguientes puntos:

- Temperatura de recepción (rango aceptado: 4- 8 °C).
- Tiempo entre la toma de muestras y la recepción, ya que deben ser procesadas dentro

de las 24 horas desde la toma de las muestras.

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

5.3 Metodología

5.3.1 Preparación de las muestras y Pre-enriquecimiento No Selectivo

5.3.1.1 Método de esponja sobre carcasa

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 ml de APT, completando un volumen total de 60 ml. Homogeneizar la muestra apretando la esponja desde el exterior de la bolsa con las manos.

Incubar el caldo de pre - enriquecimiento (APT) $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.

Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

5.3.1.2 Enjuague de carcasa:

La muestra de enjuague de carcasa debe ser recibida en un frasco que contenga al menos 30 ml. 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 ml de APT. Homogeneizar mediante agitación vigorosa.
- Incubar el caldo de pre - enriquecimiento (APT) a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.
- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

5.3.1.3 Piel cuello 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.
- Posteriormente se adiciona a la bolsa que contiene la muestra, 225 ml de Agua Peptonada Tamponada (APT) y se cierra. Todo el contenido de la bolsa se homogeniza en el stomacher por 2 minutos a velocidad media.
- Incubar el caldo de pre - enriquecimiento (APT) $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.
- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

* **NOTA:** Cabe señalar, que una vez realizado el paso anterior, con cada tipo de matriz, se debe sembrar en forma paralela una cepa de *Salmonella spp.* H₂S negativa y otra H₂S positiva, cada una en tubos con 10 ml de APT, como control positivo del método.

5.3.2. Enriquecimiento Selectivo

- Transferir 0.1 ml del cultivo obtenido en 5.3.1. (muestra con APT incubada), a un tubo con 10 ml de Caldo Rappaport-Vassiliadis con soya (RVS); posteriormente transferir 1 ml del cultivo obtenido en 5.3.1., a un tubo con Caldo Tetrationato Muller- Kauffmann con Novobiocina (TTMKn), el cual debe haber sido previamente adicionado de 0.2 ml de Yodina.
- Incubar el Caldo RVS inoculado a $41.5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas e incubar el Caldo TTMKn a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 3 horas. Cuidar de no exceder el máximo permitido en la temperatura de incubación (42.5°C).
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella spp.* H₂S negativa y H₂S positiva), ambas en cada uno de los tubos de enriquecimiento correspondiente.

5.3.3. Aislamiento en Agar Selectivo

- Después de la incubación de 24 ± 3 horas, agitar los tubos de RVS y TTMKn inoculados, utilizando el agitador o Vortex.
- Introducir el asa de aro en el interior del tubo RVS y luego sembrar por agotamiento la superficie de una placa Petri de tamaño grande (140 mm de diámetro) que contenga Agar XLD, de manera de obtener colonias bien aisladas.
- En ausencia de placas Petri de tamaño grande, utilizar 2 pequeñas (90 mm a 100 mm de diámetro), una después de la otra, utilizando la misma asa.
- Proceder de la misma forma con el segundo agar selectivo, el Agar BGA. Identificar las placas sembradas.
- Posteriormente, introducir el asa de aro en el interior del tubo TTMKn y repetir lo descrito anteriormente para la siembra del agar selectivo XLD y BGA.
- Invertir las placas y colocarlas en la estufa de cultivo a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 horas.
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella spp.* H₂S negativa y H₂S positiva), ambas en cada medio selectivo.
- Transcurrido el tiempo de incubación, examinar las placas para observar la presencia de colonias típicas de *Salmonella spp.* y de colonias atípicas que podrían ser *Salmonella spp.* Marcar la posición de las colonias seleccionadas en el fondo de la placa.
- Las colonias típicas de *Salmonella spp.* en los agares selectivos utilizados, se observan de la siguiente manera:
 - Agar BGA:** colonias rosadas, opacas, de apariencia lisa y de bordes netos, rodeadas por el color rojo del medio.
 - Agar XLD:** colonias negras o rojas con o sin centro negro y una zona clara transparente color rosado debido al cambio de color del indicador.
- 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, si no que además del batch de medio de cultivo selectivo utilizado.

5.3.4. Selección de colonias para Pruebas Bioquímicas

- De cada placa (2 placas Petri de tamaño pequeño o 1 de tamaño grande) de cada medio selectivo seleccionar al menos 1 colonia considerada típica o sospechosa y 4 colonias atípicas si la primera es negativa.
- Estriar las colonias seleccionadas en 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 $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 24 ± 3 horas.
- 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 en los medios TSI, LIA, MIO, Agar Urea, VP y ONPG.
- 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 $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 24 ± 3 hrs. 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, al Instituto de Salud Pública (I.S.P) para realizar la tipificación de la cepa.
- Además para cada colonia seleccionada, se deben efectuar pruebas de detección de β galactosidasa (ONPG) y de Reacción en medio Voges Proskauer.
- Para la prueba de detección de β galactosidasa utilizar discos ONPG, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Para la reacción en medio Voges Proskauer (VP) suspender una colonia sospechosa en tubo estéril que contenga 3 ml de Caldo RMVP.
- 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 $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 24 ± 3 hrs. (Para detección de β galactosidasa considerar temperatura indicada por el fabricante del ONPG).

5.3.5. Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

a) Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

- Fermentación de la glucosa
Fermenta la glucosa: Fondo Amarillo (A).
No fermenta la glucosa: Fondo rojo (K).
- Fermentación de la lactosa y/o sacarosa
Fermenta estos azúcares: Tendido Amarillo (A).
No fermenta: Tendido rojo (K).
- Producción de gas
Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
No produce: Sin cambios.

- Producción de H₂S
Produce H₂S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
No produce: Sin cambios.

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).

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.

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.
- Si la reacción es negativa se mantendrá el color amarillo del medio.

e) Detección de β Galactosidasa

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

f) Reacción en medio Voges Proskauer

- Después de la incubación agregar 2 gotas de solución de creatina, 3 gotas de solución etanólica de α-naftol y 2 gotas de Hidróxido de Potasio al 40%. Luego mezclar.
- La formación de un color rosa a rojizo dentro de 15 minutos indica una reacción positiva.
- El Analista debe registrar estos resultados en la Planilla de trabajo correspondiente, de acuerdo a la elaborada por cada laboratorio autorizado para este fin.

5.3.6. Cuadro Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

Agar TSI			Agar LIA			Agar MIO			Agar Urea	β-galactosidasa (ONPG)	Medio Voges-Proskauer (VP)	Microorganismo
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	GAS	H ₂ S	Mov.	Indol	Ornitina				
K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>Salmonella</i> subespecie I Otras <i>Salmonella</i> spp.
K/A	-	-	K/K	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>S. Choleraesuis</i> Otras <i>Salmonella</i> spp.
K/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Salmonella</i> Typhi
K/A	+	-	K/A	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>Salmonella</i> spp <i>S. Paratyphi</i> A.
K/A	-	-	K/A	-	-	+	-	+	-	-	-	<i>S. Paratyphi</i> A.
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> spp. <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 5 ml de solución salina al 0.85%.
- Confrontar sobre la placa de vidrio para aglutinación, mediante el uso de gotarios estériles, una gota de suspensión del cultivo con una gota del suero somático polivalente A-I. Como control agregar solamente una gota de suspensión del cultivo para detectar si se produce autoaglutinación de la cepa estudiada. Mezclar con 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.
- Se debe tener la seguridad de ocupar **colonias puras y no utilizar colonias autoaglutinantes**.
- Si la cepa no aglutina con el suero polivalente, puede deberse a la presencia de cápsula, por lo cual debe hervirse 15 minutos a una hora en baño de agua (tiempo que puede tardar en romper la cápsula). Después se debe confrontar nuevamente una gota del suero polivalente con una gota de suspensión del cultivo tratado por calor.
- Si las cepas aglutinan con el suero polivalente, 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.
- 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 Mc Farland.
- 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 48° - 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.

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	Cepas deben ser consideradas como <i>Salmonella</i> .
Típicas	No	Todas las reacciones negativas (pruebas bioquímicas adicionales)	Pueden ser <i>Salmonella</i> .
Típicas	Si	No analizables (realizar pruebas bioquímicas adicionales)	
Reacción Atípica	No/Si	Antígenos O, Vi o H Positivo	
Reacción Atípica	No/Si	Todas las reacciones negativas	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.
- 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 " "**.
- 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"**.
- 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

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP. SEGÚN ISO 6579:2002(E)

Código: D-GF-CGP-PT-029
Versión:01

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"**.

- 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, el responsable del Laboratorio debe enviarlas al I.S.P. para su tipificación.

6. REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS

Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del SAG, el cual debe contener la firma 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 cada una de las copias de acuerdo a lo señalado en el Documento General "Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras de exportación". Cabe señalar, que además debe mantener la copia rosada de los resultados para sus registros.

7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

Como señala el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, todo laboratorio autorizado será supervisado por el SAG, a través de la realización de inspecciones al laboratorio, al menos una visita al año.

El Servicio podrá realizar auditorías adicionales cuando lo estime conveniente. La respuesta a las No Conformidades y Observaciones encontradas durante la Auditoría, deberán ser contestadas por el Laboratorio Autorizado, en un plazo no superior a 10 días hábiles desde la recepción del informe de auditoría emitido por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias. La renovación de la autorización quedará supeditada a la emisión de un informe realizado por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, que indique que el Laboratorio Autorizado no posee No Conformidades que afectan el desempeño, conforme a las especificaciones contenidas en los Instructivos Técnicos y Reglamento Específico de Autorización.

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 de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias.

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

8. MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias detecta faltas en el desempeño del laboratorio autorizado, que pongan en riesgo el resultado del Programa Reducción de Patógenos 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 mediante una carta suscrita por el/la Jefe/a del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o un Jefe/a de Oficina o un Director/a Regional, el cese inmediato de las prestaciones de servicios ejecutados dentro del alcance de su autorización hasta que se implementen y verifiquen todas las acciones correctivas, producto de las no conformidades detectadas.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SPP. SEGÚN ISO 6579:2002(E)

Código: D-GF-CGP-PT-029
Versión:01

El Servicio tiene la facultad de aplicar medidas a los laboratorios autorizados que no cumplan con lo establecido en el Reglamento Específico de Autorización y el presente Instructivo Técnico, así como en el respectivo convenio de autorización, de acuerdo a las estipulaciones de este último.

El Servicio podrá, por resolución, aplicar las siguientes medidas en caso de incumplimiento por parte de los autorizados: a) suspensión de la autorización; y b) revocación de la autorización.

Las medidas señaladas se aplicarán a nivel nacional, y sin perjuicio de las sanciones que contemplan las leyes vigentes o garantías de fiel cumplimiento que el Servicio eventualmente puede exigir en los convenios de autorización.

Las suspensiones de la autorización durarán, al menos, el tiempo que requiera el laboratorio autorizado para implementar las medidas correctivas y su posterior verificación por parte del Servicio.

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.

9. ANEXOS

**LISTA DE ANALISTA(S) DEL LABORATORIO
VINCULADO AL DIAGNÓSTICO**

Código: F-GF-CGP-PT-134
Versión:01

Nombre Completo	Nº Cédula de Identidad	Firma	Técnica que realiza

Firma del postulante o representante legal

Fecha,