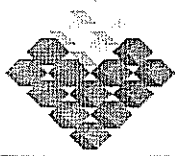


## INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA* *SPP.* MÓVILES SEGÚN METODOLOGÍA TRADICIONAL OIE.

### Tabla de Contenidos

<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1. Objetivos y Alcance	2
2. Referencias y Documentos Relacionados	2
Definiciones y Abreviaturas	2
Requisitos	3
4.1 Requisitos infraestructura equipos materiales y reactivos	3
4.2 Requisitos de personal	4
4.3 Requisitos específicos	5
4.4 Medios de verificación de Requisitos	6
5. Análisis/Ensayo	7
5.1 Captación y envío de la muestra	7
5.2 Recepción y manejo de la muestra	7
5.3 Metodología	8
5.4 Expresión de los resultados	14
6 Registro y envío de los resultados	15
7 Supervisión a los Laboratorios Acreditados	16
8 Obligaciones	16



## 1. Objetivos y Alcance

El objetivo de este instructivo es dar a conocer los requisitos específicos para la acreditación de laboratorios por parte del SAG para la realización del análisis/ensayo para el diagnóstico de *Salmonella spp.* móviles según Método Tradicional de Cultivo, descrito en manual OIE versión 2004, a partir de muestras oficiales provenientes de planteles comerciales de aves adscritos al Programa de Planteles de Aves de corral bajo Certificación Oficial y los planteles comerciales de aves que se incorporen al Programa de Control de *Mycoplasma sp.* en planteles comerciales de aves.

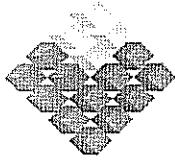
Del mismo modo, en este documento se estipulan instrucciones técnicas que deben cumplir los laboratorios para que obtengan y mantengan tal acreditación.

## 2. Referencias y Documentos Relacionados

- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025.Of 2005.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Versión vigente.
- Manual de Técnicas Diagnósticas y vacunas de animales terrestres, OIE 5° Edición, 2004.
- ISO /TS 11133-1:2000, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
- ISO /TS 11133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.
- Programa de Control de Salmonella spp. en planteles comerciales de Aves. Versión vigente.
- Reglamento específico para la Acreditación de Laboratorios Análisis/Ensayo. versión vigente.
- Instructivo Técnico para la Colecta y Envío de Muestras de Aves para Diagnóstico de Laboratorio. Versión vigente.

## 3. Definiciones y Abreviaturas

<b>MVL</b>	Médico Veterinario Laboratorio
<b>Protocolo Oficial</b>	Documento emitido por el Médico Veterinario Oficial del SAG o Médico Veterinario Acreditado: "Protocolo de Toma de Muestras del Proyecto Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Aves y Resultados Laboratorio".
<b>SAG</b>	Servicio Agrícola y Ganadero
<b>Laboratorio Oficial</b>	Laboratorio Perteneciente al Servicio Agrícola y



OIE	Ganadero
MVO	Organización Mundial de Sanidad Animal
MVA	Médico Veterinario Oficial del SAG
INN	Medico Veterinario Acreditado
ISO	Instituto Nacional de Normalización
	International Organization for Standardization

#### 4. Requisitos

##### 4.1 Requisitos infraestructura equipos materiales y reactivos

El postulante debe contar con la infraestructura requerida para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025.Of. 2005.

Equipamiento básico para realizar las actividades comprendidas en el alcance de la acreditación, de acuerdo a requisitos señalados en NCh-ISO 17025.Of. 2005.

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

##### 4.1.1. Equipos, instrumentos y materiales

- Balanza digital.
- Estufa de cultivo  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Estufa de cultivo  $41.5^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .
- Agitador de tubos o vortex.
- Asas desechables estériles
- Autoclave.
- Stomacher 80.
- Refrigerador.
- Gabinete de Bioseguridad. Clase II.
- Gotarios estériles desechables.
- Pipetas estériles de 1 y 5 ml.
- Guantes desechables estériles.
- Asa de nicrom de aro y asa en punta.
- Placas de vidrio para aglutinación.
- Lámpara o lupa con luz.
- Placas Petri plásticas desechables.
- Tubos de ensayo 13 x 10 mm.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Bolsas plásticas resellables, estériles para stomacher.





- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras y pinzas.
- Baño Termoregulado.

#### 4.1.2 Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agua Peptonada Tamponada. Frasco Schott x 225 ml.
- Caldo Selenito Cistina Doble Concentración (CSCDB).
- Caldo soya tripticasa o triptosa.
- Agar Xilosa Lisina Tergitol (XLD) con novobiocina (15.6 mg/L).
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).
- Agar Tripticasa Soya (TSA).
- Agar nutritivo
- Agar Citrato de Simond's
- Caldo RM-VP
- Solución  $\alpha$  naftol
- Solución KOH al 40%
- Reactivo de Kovacks
- Antisuero Somático (O) Polivalente A – I para *Salmonella sp.*
- Antiseros Somáticos (O) Monovalentes para *Salmonella sp.* (Grupos A – I).
- Antisuero Flagelar (H) Polivalente para *Salmonella sp.*
- API 20 E de Biomerieux u otro equivalente.
- Agua Clase 4 para preparación de medios de cultivo.
- 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%.
- Test Aglutinación en Látex (Oxoid).
- Formalina.

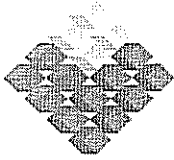
#### 4.1.3 Estándares

Se utilizarán como estándares Cepas ATCC de una *Salmonella sp* H<sub>2</sub>S negativa y otra H<sub>2</sub>S positiva, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726 Of 2002. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo. 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 de personal

##### a) Responsable Técnico:

Según lo dispuesto en el número 4.2 del Reglamento Específico para la Acreditación de Laboratorios Análisis/Ensayo, el Laboratorio debe contar con un responsable



técnico, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio acreditado, el cual debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Título profesional calificado en el área biológica, de una carrera de al menos ocho semestres académicos, con experiencia laboral comprobable en el área de laboratorio de al menos 2 años y al menos con uno de ellos en el área de microbiología.
- Haber recibido capacitación en la realización del método ***Salmonella sp* Mediante Método Tradicional de Cultivo**, según OIE, 2004 en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la acreditación comprobada mediante certificado correspondiente.

#### 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:

- Contar con título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de acreditación.
- Haber recibido capacitación en la realización del método ***Salmonella sp* Mediante Método Tradicional de Cultivo**, según OIE, 2004. en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la acreditación comprobada mediante certificado correspondiente.

**Tanto el personal técnico y/o profesional calificado** debe estar capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025.Of. 2005

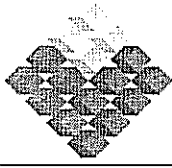
#### 4.3 Requisitos específicos

El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de NCh-ISO 17025.Of. 2005, 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 acreditación de las técnicas por el SAG, se le otorgará un plazo de 2 años para lograr la acreditación de éstas ante el INN en la Norma Chilena ya referida.

El laboratorio debe contar con los siguientes documentos:

- Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la acreditación.
- Procedimiento e Instructivos Preparación de Medios de Cultivo involucrados en el alcance de la acreditación.
- Procedimiento /Instructivo Preparación y Esterilización de Material de Vidrio

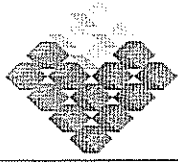


- Procedimiento /Instructivo Eliminación y Descontaminación de Residuos y Materiales
- Procedimiento /Instructivo Aseo y Limpieza de Laboratorios
- Procedimiento /Instructivo Control Biológico de Esterilidad en Autoclaves.
- Procedimiento /Instructivo de Verificación de Equipos
- Procedimiento /Instructivo 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 acreditación.
- Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.
- Programa de Mantenimiento /Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.

#### 4.4 Medios de Verificación de Requisitos

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de Acreditación, además de los antecedentes establecidos en el numeral 6.1 del Reglamento para la Acreditación de Laboratorios de Análisis /Ensayo del Servicio Agrícola y Ganadero (<http://www.sag.gob.cl>), los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG en este capítulo.

- El laboratorio solicitante deberá presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad, implementado en el laboratorio y que demuestren la acreditación en NCh-ISO 17025.Of. 2005 ante el INN, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos.
- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas (flujo de áreas limpias y sucias) y ubicación de equipos.
- Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención y calibración de estos.
- Lista de materiales, reactivos y Kits.
- Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance.
- Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista.
- Certificado de título del Responsable Técnico, en original o fotocopia legalizada.



- Certificado de título de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Documentos que acrediten la capacitación tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Instructivos especificados en el numeral 4.3 de este Instructivo.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de Acreditación como en este Instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación por 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.

## 5 Análisis/Ensayo

### 5.1 Captación y envío de la muestra

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

Para este tipo de análisis **no se utilizarán contramuestras.**

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

La toma de muestras a recolectar serán muestras de vísceras y meconio provenientes de los Planteles de aves incluidos en el punto 1 de este Instructivo según lo señalado en el Instructivo de Toma de Muestras de aves, correspondiente.

- Las muestras deben ser recolectadas asépticamente y antes de comenzar cualquier tratamiento con antibióticos, lo cual debe estar señalado en el Protocolo oficial SAG.

### 5.2. Recepción y manejo de la muestra

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

- Integridad de las muestras.
- Cantidad suficiente de muestras para el análisis.
- Identificación adecuada, de acuerdo al Protocolo Oficial SAG.
- Deben venir refrigeradas y que no excedan las 24 horas desde su recolección.
- Tipo de Muestra de acuerdo a Programa Oficial.



- Protocolo fuera del contenedor y con los datos requeridos.
- Contenedor isotérmico con sello.

### 5.3 Metodología

#### 5.3.1 Método Diagnóstico

Esta metodología se aplica a muestras de vísceras (Hígado, Vesícula biliar, Ovario, Ciego, Bazo, Corazón y Riñón) y meconio.

Para muestras de fecas y tómulas de arrastre remitirse al "Instructivo Técnico de Análisis/Ensayo para la Detección de *Salmonella spp.* (Móviles) en fecas animales según Método Tradicional ISO 6579.2002/Amd 1 (E)".

La muestra se somete a incubaciones sucesivas en diferentes tipos de medios de cultivo, los que se describen a continuación.

##### 5.3.1.1 Preenriquecimiento

Esta etapa se realiza en medio líquido no selectivo, en el cual se incuban las muestras frescas o incluidas en un medio de transporte. La finalidad es revitalizar la bacteria.

Pesar 10 a 25 g de la muestra y agregar en proporción de 1/10 agua peptonada tamponada (APT).

Incubar el caldo de pre – enriquecimiento (APT) a  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  durante 16 – 20 horas.

##### 5.3.1.2 Enriquecimiento selectivo:

Esta etapa se realiza en un medio líquido que contiene aditivos que permiten el crecimiento selectivo de *Salmonella spp.* mientras se inhibe el crecimiento de otras bacterias.

Se utiliza Caldo Selenito Cistina el cual no es inhibidor de serovariedades de *Salmonella spp.* presentes en especies animales de interés.

Agregar Caldo Selenito Cistina Doble Concentración (CSCDC) (pesar el doble de lo indicado por el proveedor), en la misma cantidad que el agua peptonada tamponada, a la bolsa que contiene la muestra e incuba a  $41.5 \pm 0.5^\circ \text{C}$  por 18-24 horas.

##### 5.3.1.3 Medio de aislamiento selectivo en placa:

El medio de elección es el Agar XLD adicionado con Novobiocina (15.6 mg/L). Es un medio sólido en el cual crece selectivamente *Salmonella spp.* e inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas.

Tomar una asada del CSCDC y sembrar por agotamiento en una placa de XLD. Luego incubar a  $37^\circ \text{C} \pm 1$  por 18-24 horas.

#### 5.3.2 Selección de colonias para Pruebas Bioquímicas





De cada placa de cada medio selectivo seleccionar hasta 5 colonias (al menos 3 colonias) consideradas típicas o sospechosas.

Si las colonias seleccionadas no se encuentran aisladas y puras, se deben estriar en la superficie de placas con TSA 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  $24 \pm 3$  horas.

En caso de existir colonias aisladas se puede proceder a la confirmación bioquímica inoculando directamente del medio selectivo.

Usar cultivos puros para la confirmación bioquímica y serológica.

Inocular cada una de las colonias en TSI, LIA, MIO.

Para lo anterior, tocar suavemente la superficie y el centro de la colonia sospechosa con el asa en punta, luego inocular el TSI en profundidad y estría en superficie. Sin flamear nuevamente, inocular el tubo de agar LIA, pinchando dos veces en profundidad y hacer estría en superficie. Luego inocular el MIO en picadura y por último, inocular dos tubos de agar TSA en estría en la superficie. Uno de los tubos de agar TSA se ocupa para realizar la confirmación serológica somática y el otro se debe mantener en refrigeración para ser enviado al Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G) para realizar la confirmación y el envío al ISP para la tipificación de la cepa, en caso de ser necesario.

Al momento de tomar el inóculo 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  $24 \pm 3$  hrs.

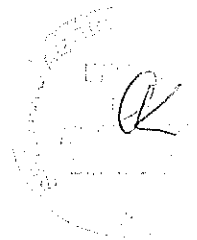
Si es necesario esta batería bioquímica se amplía con Rojo Metilo, Voges Proskauer, y Citrato de Simonds o mediante la realización de API 20E.

Las colonias que a través de pruebas bioquímicas indican sospecha de *Salmonella spp.*, deben ser confirmadas mediante la prueba de aglutinación somática (antígeno somático O).

### 5.3.3 Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

#### 5.3.3.1 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 H<sub>2</sub>S
  - Produce H<sub>2</sub>S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
  - No produce: Sin cambios.

#### 5.3.3.2 Agar Hierro Lisina (LIA)

- Descarboxilación de la lisina
  - Descarboxila la lisina: Fondo y tendido púrpura (K/K).
  - No descarboxila la lisina: Fondo amarillo (A).
- Producción de gas
  - Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
  - No produce gas: sin cambios.
- Producción de H<sub>2</sub>S
  - Produce H<sub>2</sub>S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
  - No produce H<sub>2</sub>S: Sin cambios.
- Desaminación de la lisina
  - Desamina la lisina: Tendido rojo (R).
  - No desamina: Tendido púrpura (K).

#### 5.3.3.3 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.

#### 5.3.3.4 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.

#### 5.3.3.5 Prueba Rojo de Metilo (RM).

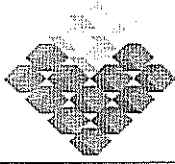
Inocular un tubo de RM-VP incubar a 37°C por 48 horas, agregar 5 gotas de reactivo Rojo de Metilo.

- Reacción positiva: Color rojo
- Reacción negativa: Color amarillo

#### 5.3.3.6 Prueba Voges Proskauer (VP)

Inocular un tubo de caldo RM-VP, incubar a 37°C por 48 horas, transferir 1 ml de este cultivo a otro tubo y agregar 0.6 ml de solución de naftol y 0.2 ml de solución de KOH al 40%. Agitar. Observar después de dos horas.

- Reacción positiva: Desarrollo de coloración rosada.



- Reacción negativa: Color café pardo.

### 5.3.3.7 Prueba de Citrato

Inocular en profundidad y superficie. Incubar a 37°C por 96 horas.

- Reacción positiva: viraje del color verde a azul.

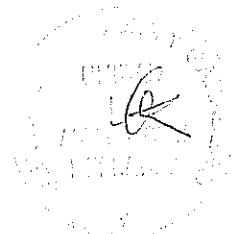
Esta se produce cuando la bacteria es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono.

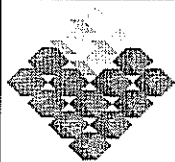
### 5.3.3.8 Cuadro Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

Agar TSI			Agar LIA			Agar MIO			Microorganismo
TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	LIA	GAS	H <sub>2</sub> 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 sp. 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 sp. Citrobacter freundii</i> *

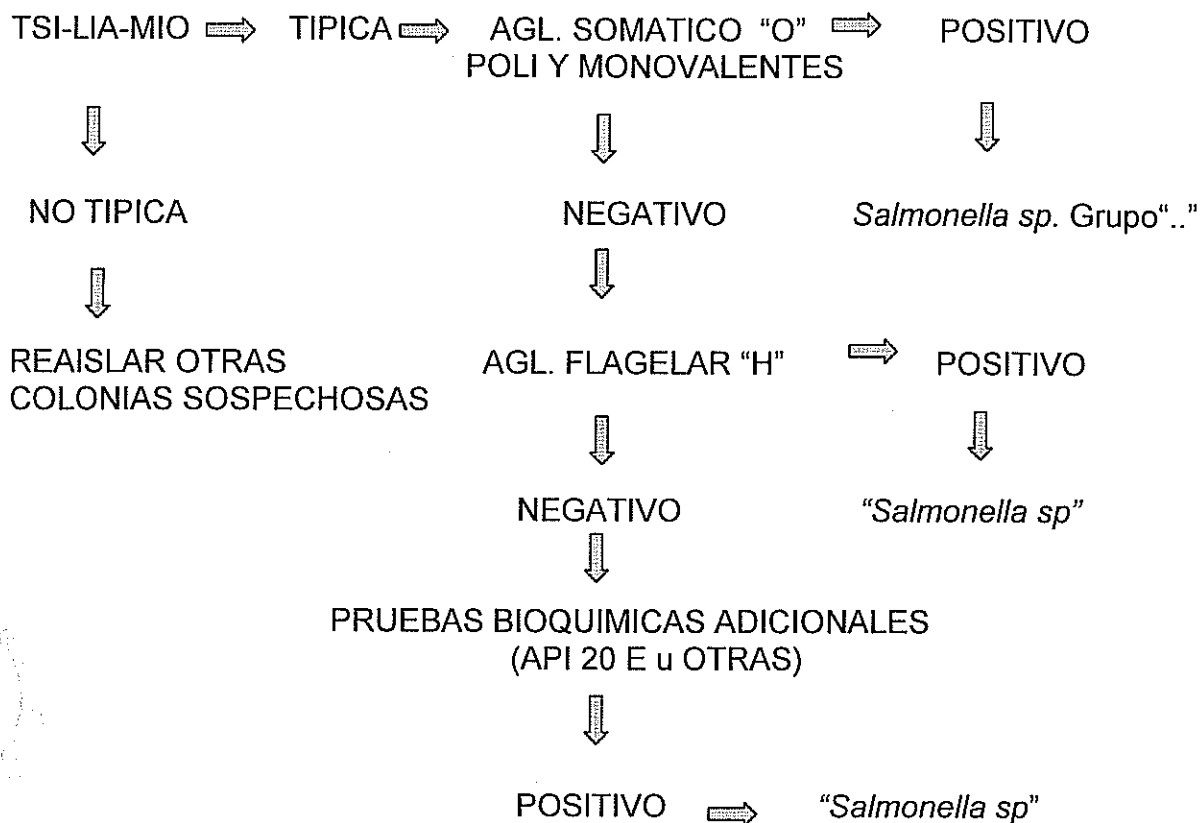
\* Puede dar reacciones similares.

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





### 5.3.3.9 Esquema de pruebas bioquímicas y serológicas.



### 5.3.4 Pruebas confirmatorias

#### 5.3.4.1 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 sp*, de acuerdo a lo descrito en Punto 5.3.4.6.

Se ocupa uno de los tubos de agar tripticosa 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.

Mover la placa de vidrio para aglutinación suavemente por 30 a 60 segundos, preferentemente con la ayuda de una lupa observando la presencia de grumos con una lámpara contra fondo oscuro.

**Si la cepa autoaglutina NO** puede ser seroagrupada y necesita pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por API 20 E.

Si el cultivo **no autoaglutina**, se debe confrontar en lámina de vidrio, una gota de suero polivalente somático A-I, con una gota de la emulsión del cultivo puro, mediante utilización de un gotario estéril desechable. Se mezcla con el asa hasta obtener una suspensión turbia y homogénea.

Mover la lámina de vidrio suavemente por 30 a 60 segundos. Observar la presencia de grumos utilizando un fondo negro, preferentemente con la ayuda de una lupa.

Si la cepa no aglutina con el suero polivalente (A-I), 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 sp.* 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 la cepa **NO aglutina** con ningún suero monovalente somático y posee pruebas bioquímicas características de *Salmonella sp.*, debe continuarse con la serología flagelar.

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

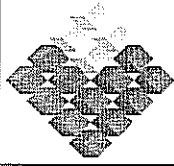
Inocular el cultivo proveniente del agar TSA en 5 ml de Caldo tripticasa soya (CTS). Incubar a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C durante 18 a 24 horas o hasta que el desarrollo bacteriano alcance una densidad de 3 en la escala de Mc Farland.

Adicionar al CTS inoculado, 5 ml de solución salina que contenga 0.6% de formalina y dejar reposar 1 hora. En dos tubos distribuir 1 ml de esta preparación (se coloca 0,5 ml en cada tubo).

Es recomendable que la concentración final del antígeno se encuentre entre 2 o 3 de Mc Farland.

Luego, a uno de los tubos agregar 0,5 ml de antisuero polivalente H a dilución de trabajo, de acuerdo a instrucciones del fabricante.

**Preparación de la dilución de trabajo para el antisuero flagelar H, polivalente A-Z BD DIFCO:** se utiliza en una dilución 1:25. Añadiendo 0,1 ml de antisuero



reconstituido a 2,5 ml de solución de Na Cl 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.

El otro tubo usarlo como control de autoaglutinación.

Incubar ambos tubos a 48 – 50° C en baño de agua hasta 1 hora.

Sacar los tubos del baño termorregulado, evitando agitarlos en exceso antes de efectuar la lectura de la reacción.

Efectuar la lectura en el tubo de autoaglutinación para verificar la presencia de flóculos. Si esta reacción es positiva, la prueba de aglutinación no es válida por tanto no proceda a la lectura del tubo de prueba. Si no hay evidencia de floculación en el tubo, proceda 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 Látex para *Salmonella* de Oxoid (seguir las instrucciones del fabricante).

Registrar presencia o ausencia de aglutinación.

#### 5.4 Expresión de los resultados

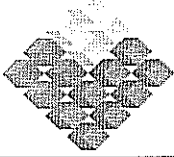
Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella* y si las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente y monovalente son positivas, se informa como **Presencia de *Salmonella* sp. Grupo “\_\_”**.

Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella* y las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente son negativas y positivas con el antisuero flagelar polivalente (H), se informa como **Presencia de “*Salmonella* sp”**.

Si después de seguir el flujograma descrito en el Punto 5.3.4.7, la aglutinación con el antisuero polivalente flagelar no ocurre, se deben realizar pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por el API 20 E. Si el resultado de estas pruebas es positivo, se informa como **Presencia de “*Salmonella* sp.”**.

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* sp.**

Una vez que se haya seroagrupado la cepa, el responsable técnico del Laboratorio Acreditado debe gestionar el envío de ésta al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, para realizar la confirmación del aislamiento, adjuntando la información de los resultados de las pruebas bioquímicas e identificándola con el número de muestra consignado en el Protocolo Oficial original.



## 6 Registro y envío de Resultados

Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial de Toma de muestras del Proyecto Nacional de Vigilancia en Aves, el cual debe ser firmado por el responsable técnico del laboratorio.

Los resultados serán comunicados al MVA de la empresa, MVO del sector en el cual se tomaron las muestras y Nivel Central SAG mediante el envío, dentro de las 48 hrs. siguientes de obtenidos los resultados, de una copia del protocolo por fax o un correo electrónico, adjuntando el resultado en el formato digital correspondiente al programa Adobe Acrobat Profesional® o por cualquier otro medio que sea instruido por la División de Protección Pecuaria.

Además, el responsable técnico del laboratorio acreditado, debe enviar los resultados en el Protocolo Oficial de Toma de muestras del Proyecto Nacional de Vigilancia en Aves al MVO correspondiente al sector en el que se tomo la muestra. Este último, despachará cada una de las copias de acuerdo a lo señalado en Manual de Programa de Enfermedades Vigiladas en Aves.

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

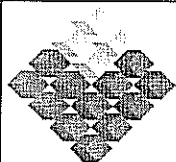
El Laboratorio Oficial SAG enviará los resultados de la tipificación entregada por el Instituto de Salud Pública, de las cepas de *Salmonella sp.* remitidas por el Laboratorio Acreditado, al nivel central, MVO del sector correspondiente al lugar de la obtención de la muestra y al Laboratorio Acreditado que envió el aislado.

## 7 Supervisión a los Laboratorios Acreditados

Todo laboratorio acreditado será supervisado mediante visitas de auditorías de seguimiento al menos una vez al año. Sin embargo, deberá estar dispuesto a recibir auditorías adicionales a la de seguimiento, en cualquier momento.

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

El laboratorio acreditado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales o internacionales, en el momento que el Servicio lo requiera. Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias detecta faltas en el desempeño del Laboratorio Acreditado, que afecten negativamente el resultado del Programa Oficial asociado a su acreditación, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de acreditación, podrá instruir al Laboratorio Acreditado mediante una carta suscrita por el/la jefe (a) del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o un jefe de oficina, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su acreditación.



## 8. Obligaciones

El postulante no podrá ejercer como laboratorio acreditado cuando el representante legal, socios, directores, accionistas, gerentes, responsable técnico o analistas tengan un interés directo con la actividad para la cual el laboratorio está postulando, tal como ser el propietario de la o las granjas sobre las cuales se está haciendo el diagnóstico, u otras que determine el Servicio.







