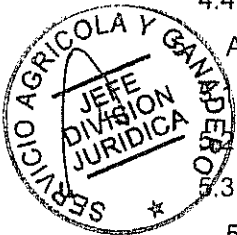


**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella* Mediante Método
Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05**

Tabla de Contenidos

Contenido	Página
1 Objetivos y Alcance	2
2 Referencias y Documentos Relacionados.....	2
3 Definiciones y Abreviaturas	2
4 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
Análisis/Ensayo.....	6
Captación y envío de la muestra	6
Recepción y manejo de la muestra.....	7
5.3 Metodología	7
5.3.1 Preparación de la muestra y pre - enriquecimiento NO selectivo.....	7
5.3.2 Enriquecimiento selectivo.....	8
5.3.3 Realización del Test VIDAS® EASY SLM	8
5.3.4 Confirmación	11
i) Aislamiento en agar selectivo.....	11
ii) Pruebas bioquímicas	11
Confirmación basada en la identificación de antígenos somáticos (O) de <i>Salmonella</i>	14
Confirmación basada en la identificación de antígeno flagelar (H) de <i>Salmonella</i>	15
5.4 Cálculo y expresión de los resultados	15
6 Registro y envío de resultados	16
7 Supervisión a los laboratorios acreditados.....	16
8 Obligaciones	16





**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

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 ***Salmonella* Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05**.

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

Este procedimiento aplica para muestras de piel de cuello de ave, enjuague de carcasa de aves y esponjas de superficie de carcasas, las cuales corresponden a muestreos microbiológicos oficiales tomados desde plantas de faenamiento de productos pecuarios de exportación.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726. Of. 2002.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- NCh 3162/1. Of. 2008, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Guía para la preparación y producción de medios de cultivo- Parte I: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.
- NCh 3162/2. Of. 2008, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Guía para la preparación y producción de medios de cultivo- Parte II: Guía práctica para los ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- Reglamento específico para la Acreditación de Laboratorios Análisis/Ensayo. versión vigente.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá Versión vigente.
- VIDAS Salmonella SLM REF 30702. Instructivo Técnico Biomerieux. Versión vigente.
- Manual de uso Equipo VIDAS® o MiniVidas.
- Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG. Versión vigente.
- Programa de Control Microbiológico de carnes faenadas para exportación. SAG. Versión vigente.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Protocolo Oficial SAG: Documentos emitidos por profesionales del SAG: "Protocolo de Toma de Muestra *E.coli*. Programa de Reducción de Patógenos", "Protocolo de Toma de Muestras y Resultados Laboratorio".

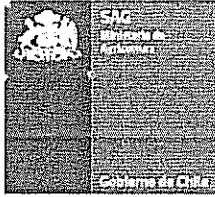
USDA: United States Department Agriculture.

FSIS: Food Safety and Inspection Service.

SAG: Servicio Agrícola y Ganadero.

ISO: International Organization for Standardization.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

SAC: Sistema de Aseguramiento de la Calidad.
MVO: Médico Veterinario Oficial del SAG.
INN: Instituto Nacional de Normalización.
AFNOR Asociación Francesa de Normalización

4 REQUISITOS

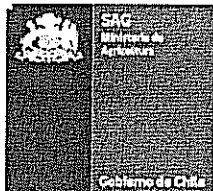
4.1 Requisitos infraestructura, equipos, materiales y reactivos

i) 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).

ii) Equipos, instrumentos y materiales

- Balanza digital.
- Sistema automatizado VIDAS®
- Bloque calefactor VIDAS®:Heat and Go (opcional)
- Estufa de cultivo 37° ± 1°C.
- Estufa de cultivo 41,5° ± 1 °C.
- Baño de agua termoregulado 48°-50 °C. y 95 a 100 °C.
- Agitador de tubos o vortex.
- Autoclave.
- Stomacher 80 o 400
- Refrigerador.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Gotarios estériles.
- 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.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Bolsas plásticas resellables, estériles.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras y pinzas.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

iii) Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agua Peptonada Tamponada. (ISO 6579:2002) Frasco Schott x 225 ml o en botella para dispensar 50 y/o 30 ml
- Caldo SX2. Ref 42. 121. Biomerieux. Tubos tapa rosca x 10 ml.
- Caldo soya tripticasa o triptosa.
- Kit VIDAS Salmonella SLM fecha vigente
- Agar Xilosa Lisina Tergitol (XLD) o
- Agar SM2 chromID Salmonella
- Agar Doble Modificado Lisina Hierro (DMLIA) o
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).
- Agar Tripticasa Soya (TSA).
- Antisuero Somático (O) Polivalente A – I para *Salmonella* sp.
- Antisueros 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.
- 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%.

iv) Estándares

Se utilizarán como estándares Cepas ATCC de una *Salmonella* sp H₂S negativa y otra H₂S positiva, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726. 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 numeral 4.2 del Reglamento Específico para la acreditación de Laboratorios de 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 análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología.
- Haber recibido capacitación en Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 para determinación de *Salmonella*, en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la acreditación, comprobable mediante certificado correspondiente.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

- 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.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a acreditar.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

b) Analista(s):

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

- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de acreditación.
- Haber recibido capacitación y demostrar competencia en la realización del Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 para determinación de *Salmonella* en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la acreditación, comprobable mediante certificado correspondiente.
- 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.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a acreditar.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

4.3 Requisitos específicos

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 acreditación de las técnicas por el SAG, se le otorgará un plazo de 2 años para lograr la acreditación de éstas ante el INN.

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.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

- 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.
- Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales.

4.4 Medios de verificación de requisitos

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. Versión vigente, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos.

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.

- 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 que acredita el número de semestres de la carrera cursada.
- 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.
- Documentos que acrediten la competencia técnica 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.

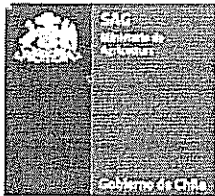
Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de Acreditación como en este Instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación por los medios que considere idóneos para tal efecto.

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



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

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

La toma y envío de muestras deben ser realizada por el Médico Veterinario Oficial del SAG (MVO), el cual debe adjuntar las muestras a un Protocolo Oficial SAG, en cuyo documento debe señalar al menos 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 "Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos 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 "Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos 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 Manual 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 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) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 16 – 22 horas.
 - Continuar como se indica en el punto 5.3.2.
- **Enjuague de carcasa (especies detalladas en el Manual del SAG señalado en las referencias):**
 - La muestra de lavado de carcasa debe ser recibida en un frasco que contenga 30 ml de agua de enjuague. Deben utilizarse frascos diferentes para cada análisis de *Salmonella sp* y *E.coli*.
 - Traspasar los 30 ml del enjuague a una bolsa de plástico estéril y adicionarle 30 ml de APT. Homogenizar en stomacher aproximadamente por 2 minutos o agitar fuertemente.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

- 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:**
 - 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). 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.

* **NOTA:** Cabe señalar, que una vez realizado el paso anterior, se debe sembrar en forma paralela una cepa *Salmonella* sp 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 ± 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 (*Salmonella* sp H₂S negativa y H₂S positiva), 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 la tarjeta MLE

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.

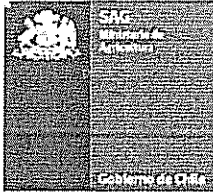
Es posible introducir las especificaciones manualmente o de forma automática gracias a la tarjeta MLE.

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.

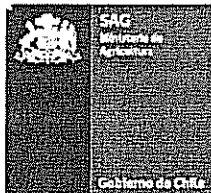
El estándar, identificado por S1, será analizado por duplicado (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV ("Relative Fluorescent Value") fijados. Si no es así, la media no será memorizada: Repetir una calibración.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

5.3.3.3 Realización del test

- Sacar únicamente los reactivos necesarios, dejarlos 30 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización.
- 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.
- 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".
- Homogeneizar bien el estándar, los controles y las muestras a analizar, con un mezclador tipo vortex.
- 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. Cierre el tubo. Hierva durante 15 ± 1 minutos a 95 - 100 ° 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 la muestras del cartucho VIDAS. Caliente durante 15 ± 1 minutos, quite el cartucho del bloque, deje enfriar durante 10 minutos.
- Mantenga el caldo SX2 sin inactivar a 2-8 ° 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 °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 ± 1° C.
- Coloque los pocillos y los conos en el equipo VIDAS siguiendo el orden de identificación creado en la pantalla del equipo.
- Efectúe el test VIDAS de acuerdo a las indicaciones de operación del equipo de acuerdo a instrucciones del fabricante.
- Conserve el registro de resultados del equipo.
- Todos los resultados positivos deben ser confirmados a partir del caldo SX2
- Dispensar 500 ul de estándar, muestra y controles en el pocillo de muestra del cartucho.
- 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.
- Lanzar el análisis (ver Manual de Utilización). Todas las etapas están controladas automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en aproximadamente 45 minutos.
- Al finalizar el análisis, retirar los conos y los cartuchos del sistema utilizando guantes estériles desechables.
- Eliminar los conos y cartuchos utilizados en un recipiente apropiado, resguardando las normas de bioseguridad.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

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 Fluórese 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*.

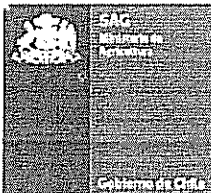
Todos los resultados positivos emitidos por el test VIDAS®, se consideran como **presuntivos** y deben ser confirmados por el método tradicional de cultivo, de acuerdo a lo señalado en el punto 5.3.4.

Los **resultados no válidos** pueden aparecer cuando:

La lectura del ruido de fondo es superior a un umbral pre-determinado (indicando una contaminación del substrato). 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*.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

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.

i) Aislamiento en agar selectivo

- Agitar los tubos de SX2, utilizando el agitador o Vortex.
- 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 (*Salmonella sp* H₂S negativa y H₂S positiva), ambas en el medio selectivo.
- Incubar las placas a 36 ± 1° C o de acuerdo a la información del fabricante del medio empleado.
- Examinar las placas dentro de 18 a 24 hrs. Seleccionar 1 a 5 colonias de acuerdo a la presentación característica de las colonias de *Salmonella sp* en cada agar.
 - o SM2 chromID Salmonella: colonias rosadas a malva, de apariencia lisa y de bordes netos.
 - o 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.
 - o Agar DMLIA: Seleccionar colonias púrpuras con o sin centro negro.
- 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.

ii) Pruebas bioquímicas

- Seleccionar a lo menos una colonia típica o sospechosa de cada medio selectivo y posteriormente cuatro si la primera es negativa, para realizar las pruebas bioquímicas. Esto debe realizarse antes de que cualquier muestra sea informada como ausencia de *Salmonella sp*.
- Inocular cada una de las colonias en TSI, LIA, MIO y TSA.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

- 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.
- Una vez finalizado el paso anterior, se deben realizar las baterías bioquímicas para las cepas controles del método.
- Uno de los tubos de agar TSA se ocupa para realizar la confirmación serológica y el otro se debe mantener en refrigeración para ser enviado al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, para realizar la confirmación del aislamiento.
- Incubar todos los medios utilizados para la batería bioquímica a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 hrs.
- En caso de obtener resultados discordantes, se recomienda seguir los siguientes protocolos adicionales
 - o Transferir 0,1 ml de caldo SX2 en 10 ml de caldo RVS.
 - o Tras una incubación de 18 a 20 horas a $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ aislar sobre agares selectivos.

iii) Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

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.

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.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

- Desaminación de la lisina
Desamina la lisina: Tendido rojo (R).
No desamina: Tendido púrpura (K).

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.

Cuadro 1: Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

Agar TSI			Agar LIA			Agar MIO			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>
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</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> subsp. I <i>Salmonella</i> subg. III (Arizona)
K/A	+	+	K/A	+	+	+	-	+	<i>Salmonella sp.</i> <i>Citrobacter freundii</i> *

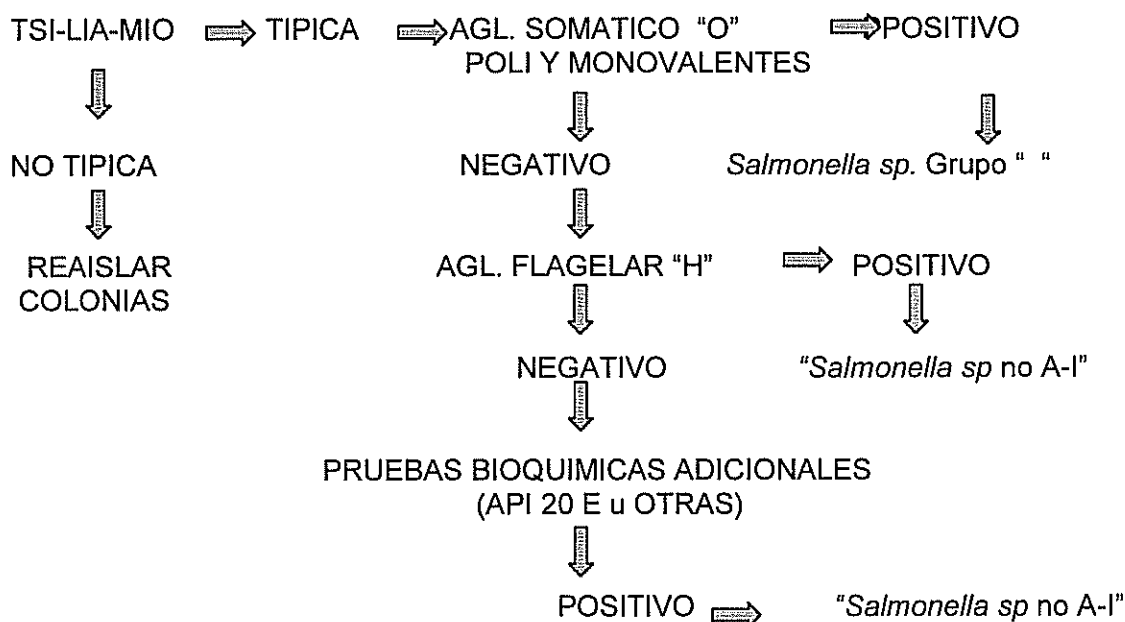
* Puede dar reacciones similares.

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



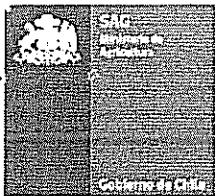
Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05

Esquema 1: Pruebas bioquímicas y serológicas



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

- Para la confirmación serológica se toma al menos una colonia por placa que cumpla con las pruebas bioquímicas características para el género *Salmonella sp*, de acuerdo a lo descrito en Punto 5.3.4. Cuadro 1.
- 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.
- Mover la placa de vidrio para aglutinación con 20 vueltas de vaivén 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 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 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.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO
12/16-09/05**

- Si la cepa **NO aglutina** con ningún suero monovalente somático y posee pruebas bioquímicas características de *Salmonella sp.*, debe continuarse con la serología flagelar.

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 $35^{\circ} \pm 1^{\circ}$ 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 $48^{\circ} - 50^{\circ}$ C en baño de agua hasta 1 hora. Evitar agitarlos en exceso.
- Sacar los tubos del baño termostático 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 Látex para *Salmonella* de Oxoid (seguir las instrucciones del fabricante).
- Registrar presencia o ausencia de aglutinación.

5.4 Cálculo y 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* no A – I”**.

Si después de seguir el flujograma 1 descrito en el Punto 5.3.4. iii), la aglutinación con el antisuero polivalente flagelar no 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 sp* no A – I”**.

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



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*.
Mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR B10
12/16-09/05**

Una vez que se haya serogrupo la cepa, el responsable del Laboratorio debe enviarlas, adjuntando la información de los resultados de las pruebas bioquímicas e identificándola con el número de muestra y número de Protocolo consignado en el Protocolo Oficial original, al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias para realizar la confirmación del aislamiento. Este envío debe ser efectuado en un lapso no mayor de 10 días, desde la fecha de obtención de la cepa.

6 REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS

Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del S.A.G., 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 S.A.G. de acuerdo a lo señalado en los Manuales correspondientes. Cabe señalar, que además debe mantener una copia de los resultados para sus registros.

7 SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS ACREDITADOS

Todo laboratorio acreditado será supervisado mediante visitas de auditorías de seguimiento al menos una vez 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 Acreditado, 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 acreditación quedará supeditada a la emisión de un informe, que indique que el Laboratorio Acreditado no posee No Conformidades que afectan el desempeño, conforme a las especificaciones contenidas en los Instructivos Técnicos y Reglamento Específico de Acreditación.

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 acreditado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales y/o internacionales, en el momento que el Servicio lo requiera.

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.