

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y
DIAGNÓSTICO DE *SALMONELLA SPP.* EN
PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS DE
EXPORTACIÓN**

Contenido

1	OBJETIVOS Y ALCANCE.....	4
2	REFERENCIAS NORMATIVAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	4
3	DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	5
4	REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN.....	6
4.1	Requisitos de Infraestructura, equipos, materiales y reactivos.....	6
4.1.1	Infraestructura	6
4.1.2	Equipamiento.....	6
4.1.3	Instrumentos y materiales	7
4.1.4	Reactivos, soluciones y medios de cultivo.....	7
4.1.5	Estándares.....	8
4.2	Requisitos de personal de laboratorio	8
4.2.1	Responsable técnico	9
4.2.2	Analistas	9
4.3	Requisitos del personal para muestreo	10
4.3.1	Jefe de equipo	10
4.3.2	Personal de apoyo.....	10
4.4	Requisitos específicos.....	10
4.5	Medios de verificación de requisitos	11
5	DESCRIPCIÓN DEL MUESTREO Y ANALISIS.....	12
5.1	Captación de las muestras	12
5.2	Incorporación como usuario al Sistema Informático SAG	13
5.3	Traslado o envío de muestras.....	13
5.4	Recepción y manejo de la muestra.....	13
5.5	Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento no selectivo	14
5.6	Metodología de diagnóstico.....	14
5.6.1	Test VIDAS EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05	14
5.6.2	Test Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09.....	17
5.6.3	Microbiología Tradicional basada en ISO 6579	19
5.7	Confirmación.....	20

5.7.1	Aislamiento en agar selectivo	20
5.7.2	Pruebas bioquímicas.....	21
5.7.3	Confirmación basada en la identificación de antígenos somáticos (O) de <i>Salmonella</i>	23
5.7.4	Confirmación basada en la identificación del antígeno polivalente flagelar (H) de <i>Salmonella</i>	24
5.8	Cálculo y expresión de los resultados.....	24
5.9	Variación de la metodología.....	25
6	REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS	25
7	SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	26
8	OBLIGACIONES	27
9	FORMULARIOS.....	27

1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este documento es establecer los requisitos y procedimientos que deberán cumplir los(as) interesados(as) que, voluntariamente, postulen ante el SAG, para operar como laboratorio autorizado en la ejecución de la toma de muestras y el diagnóstico de *Salmonella spp.*, mediante las metodologías de análisis que en este Instructivo se señalan, en productos hortofrutícolas de exportación, ya sea que estas actividades se realicen como parte de los programas de monitoreo que lleve a cabo el SAG y/o para dar respuesta a requerimientos de las autoridades de los países de destino.

El alcance de la autorización corresponderá a la colecta de muestras en:

- Plantas de proceso y embalaje en el producto final.

El procedimiento de diagnóstico a utilizar por el laboratorio autorizado, puede ser uno, o más de uno, de los siguientes métodos:

- Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 y confirmación bioquímica y serológica.
- Método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09 y confirmación bioquímica y serológica.
- Microbiología Tradicional basada en ISO 6579 y confirmación bioquímica y serológica.

Sin perjuicio de lo anterior, en caso de que el Servicio lo requiera, podrá ampliar o modificar las técnicas diagnósticas que forman parte del alcance de esta autorización SAG, frente a lo cual, los laboratorios que deseen mantener su autorización en esta categoría, deberán realizar o modificar dichas técnicas, entregando previamente al SAG toda la documentación correspondiente.

Las actividades relacionadas al proceso de muestreo deberán ser desarrolladas de acuerdo a los métodos y procedimientos específicos establecidos por el SAG en el documento "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación".

Esta autorización se otorgará con carácter nacional.

Las disposiciones del presente instructivo serán aplicables a todas las personas naturales o jurídicas que voluntariamente postulen a la autorización referida en este documento.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS 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.
- Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos, versión vigente. Servicio Agrícola y Ganadero.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá Versión vigente.

- Manual de uso Equipo VIDAS® o MiniVidas.
- VIDAS Salmonella SLM REF 30702. Instructivo Técnico Biomerieux.
- Assurance GSD Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09. Instructivo Técnico Biocontrol.
- Manual de uso Equipo Assurance GDS Rotor-Gene.
- International Standard ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- International Standard ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*
- Instructivo Técnico de Análisis/Ensayo para *Salmonella* Mediante Método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09. Servicio Agrícola y Ganadero.
- Instructivo Técnico de Análisis/Ensayo para *Salmonella* mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05.
- Detección de Bacterias Causantes de Cancrosis desde Frutas Asintomáticas a Campo y en Galpón de Empaque. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Boletín Informativo del Departamento Frutales. Argentina. Citrusmisiones N°31,19p. 2006.
- Colonización de *Salmonella spp.* sobre Manzanas “Golden Delicious”, “Rayada” y “Red Delicious” de La Sierra de Querétaro y su Sobrevivencia a Agentes Germicidas. Tesis Magister. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. México, 2012. 98p.
- Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación. Servicio Agrícola y Ganadero.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- **FSIS:** Food Safety and Inspection Service.
- **SAG:** Servicio Agrícola y Ganadero.
- **ISO:** International Organization for Standardization.
- **AOAC:** Association of Official Analytical Chemists.
- **SAC:** Sistema de Aseguramiento de la Calidad.
- **INN:** Instituto Nacional de Normalización.
- **AFNOR:** Asociación Francesa de Normalización
- **Laboratorio Autorizado:** Persona natural o jurídica reconocida y aprobada por el Servicio para ejecutar uno o más análisis/ensayos determinados, en el marco de programas oficiales del SAG, bajo condiciones definidas por el Reglamento específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos y los correspondientes instructivos técnicos.

4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN

4.1 Requisitos de Infraestructura, equipos, materiales y reactivos

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.

Respecto del muestreo, debe contar con infraestructura destinada a:

- Disposición de equipos o instalaciones.
- Mantención de muestras y resguardo de la integridad de éstas.
- Mantención de registros documentales.

4.1.2 Equipamiento

El laboratorio debe contar con los equipos necesarios, acordes al volumen de muestras, que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar.

Deben contar con su certificado de mantención y/o calibración al día, efectuado a lo menos una vez cada 2 años por una empresa pertinente y reconocida en el área, y un programa de mantención y calibración de éstos de acuerdo a las necesidades y requerimientos del Laboratorio.

A continuación se detalla el equipamiento mínimo que se debe considerar:

- Balanza digital entre el rango de los 250g y 2.500g.
- 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 $48-50^{\circ}\text{C}$ y $95-100^{\circ}\text{C}$.
- Agitador de tubos o vortex.
- Autoclave para medios, tampones y material limpio.
- Autoclave para descontaminación.
- Agitador orbital o Stomacher dependiendo del tamaño de la muestra.
- Refrigerador.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Congelador.

Adicional para método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05:

- Sistema automatizado VIDAS® o Minividas.
- Bloque calefactor VIDAS®:Heat and Go (opcional)
- Impresora asociada al equipo VIDAS.

Adicional para método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09:

- Assurance GDS Rotor-Gene y PC asociado.
- GDS agitador vortex.

Asimismo, para las labores de muestreo se debe contar con lo siguiente:

- Vehículo adecuado para las labores relacionadas al muestreo.
- Computador.
- Equipo e instalaciones de refrigeración de uso exclusivo.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ (de uso exclusivo para terreno)

4.1.3 Instrumentos y materiales

- Gotarios estériles.
- Pipetas desechables 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.

Adicional para método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09:

- Dispensador de volumen a repetición.
- Micropipeta p10, p200, p1.000.
- Micropipeta multicanal p20.
- Pipeta repetidora y puntas adecuadas a los volúmenes usados.
- Pickpen 8M.
- GDS celdas de concentración de muestras.
- GDS placas de resuspensión.
- GDS film adhesivo protector.
- GDS bloque base concentración muestras.
- Puntas estériles desechables.
- Bloque de aluminio.

Respecto del muestreo, deben contar con los instrumentos y materiales que se establecen en el documento "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación". Principalmente un termómetro calibrado o contrastado, en las temperaturas de refrigeración requeridas, para verificar la mantención de la cadena de frío durante el transporte hasta la recepción en el laboratorio.

4.1.4 Reactivos, soluciones y medios de cultivo

El laboratorio debe contar con los reactivos, soluciones y medios de cultivos necesarios, acordes al volumen de muestras (stock suficiente para los análisis de la temporada) y que garanticen el correcto desarrollo de la técnica de análisis a realizar.

A continuación se detallan los reactivos, soluciones y medios de cultivos que se deben considerar como mínimo:

- Agua Peptonada Tamponada. (ISO 6579:2002) Frasco Schott x 500ml o en botella para dispensar.
- Caldo soya tripticasa o triptosa.
- Caldo Rappaport-Vaissiliadis con Soya (caldo RVS).
- Caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobioacina (caldo MKTTn).
- Agar Xilosa Lisina Deso-exicolato (XLD)
- Segundo medio selectivo según ISO 6579.
- 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 spp.* (Difco o Equivalente).
- Antisueros Somáticos (O) Monovalentes para *Salmonella spp.* (Grupos A–I). (Difco o Equivalente).
- Antisuero Flagelar (H) Polivalente para *Salmonella spp.* (Difco o Equivalente).
- 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%.

Adicional para método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05:

- Caldo SX2. Ref 42. 121. Biomerieux. Tubos tapa rosca x 10 ml.
- Kit VIDAS Salmonella SLM fecha vigente.
- Agar SM2 chromID Salmonella

Adicional para método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09:

- Kit assurance GDS Salmonella Biocontrol fecha vigente.
- Caldo cerebro corazón.

4.1.5 Estándares

Se utilizarán como estándares dos cepas ATCC o de colecciones de referencia, una de *Salmonella spp.* 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 las cepas ATCC recomendadas por el fabricante, tanto para controles positivos como controles negativos.

4.2 Requisitos de personal de laboratorio

El postulante debe contar con el siguiente personal para las labores de diagnóstico:

4.2.1 Responsable técnico

Según lo dispuesto en el Reglamento Específico para la autorización 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 autorizado, el cual debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Título profesional del área biológica o afín, de preferencia Ingeniería Agronómica, Biología, Microbiología, Ingeniería en Alimentos, Bioquímica, Biotecnología. Con experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología, específicamente en análisis de alimentos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Dependiendo del Método de Diagnóstico solicitado a Autorizar por el SAG, haber recibido capacitación en Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 para determinación de *Salmonella* y/o Método Screening Assurance GSD *Salmonella* AFNOR TRA 02/12/-01/09 y/o ISO 6579:2002, comprobable mediante el 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 autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar. Deberá presentar un Informe que especifique los análisis realizados por el personal que se está postulando y los criterios escogidos para demostrar competencia.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

4.2.2 Analistas

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

- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización, con experiencia laboral comprobable en el área análisis de laboratorio de al menos 6 meses, específicamente en análisis bacteriológico de alimentos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Dependiendo del Método de Diagnóstico solicitado a Autorizar por el SAG, haber recibido capacitación en Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 para determinación de *Salmonella* y/o Método Screening Assurance GSD *Salmonella* AFNOR TRA 02/12/-01/09 y/o ISO 6579:2002, comprobable mediante el 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 autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar. Deberá presentar un Informe que especifique los análisis realizados por el personal que se está postulando y los criterios escogidos para demostrar competencia.

- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

4.3 Requisitos del personal para muestreo

El postulante deberá contar con 1 o más equipos de muestreo, los cuales estarán conformados por al menos 2 personas, a saber:

4.3.1 Jefe de equipo

El Jefe de equipo deberá cumplir con el siguiente perfil:

- Título profesional del área biológica, de preferencia Ingeniería Agronómica, con experiencia laboral comprobable en el área de toma de muestras y análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Debe tener una preparación idónea para la actividad o función a desempeñar, con competencia demostrable mediante certificados de cursos u otros.

4.3.2 Personal de apoyo

El personal de apoyo deberá cumplir con lo siguiente:

- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Debe tener una preparación idónea para la actividad o función a desempeñar, con competencia demostrable mediante certificados de cursos u otros.

4.4 Requisitos específicos

- El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de Norma-ISO 17.025, versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN u otro organismo de acreditación, en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos.
- Para aquellos casos en que el laboratorio no tenga, al momento de postular, acreditada una técnica según la ISO 17.025, o no esté en proceso de tramitación, el Servicio podrá otorgar la autorización, siempre y cuando el laboratorio cumpla con los demás requisitos y se comprometa a presentar la solicitud de acreditación de la técnica ante el organismo acreditador dentro de los 6 meses siguientes a la fecha de la Resolución SAG de Autorización del laboratorio.
- El Laboratorio debe contar con 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 Mantención /Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales.

Respecto de las labores relacionadas con el proceso de muestreo, éstas deberán ser desarrolladas de acuerdo a los métodos y procedimientos específicos establecidos por el SAG en el documento "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación", versión vigente.

4.5 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. Además, si el laboratorio cuenta con la acreditación en NCh-ISO 17025, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos, deberá presentar la documentación de respaldo.

Para aquellos casos en que el laboratorio no tenga, al momento de postular, acreditada una técnica según la ISO 17.025, o no esté en proceso de tramitación, el Servicio podrá otorgar la autorización, siempre y cuando el laboratorio cumpla con los demás requisitos y se comprometa a presentar la solicitud de acreditación de la técnica ante el organismo acreditador dentro de los 6 meses siguientes a la fecha de la Resolución SAG de Autorización del laboratorio.

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de Autorización, además de los antecedentes establecidos en el numeral 6.1 del Reglamento para la Autorización 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 éstos.
- 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 (titular y subrogante).
- Certificado de título del Responsable Técnico y su subrogante, 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.
- 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 4.4 de este Instructivo.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de Autorización 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, a uno o más analistas, o al personal de muestreo, identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica.

5 DESCRIPCIÓN DEL MUESTREO Y ANALISIS

5.1 Captación de las muestras

El muestreo debe ser realizado por personal del laboratorio autorizado que seleccione la planta de proceso y embalaje o exportador, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Servicio.

Al momento de realizar la toma de muestras en las plantas de proceso y embalaje, los muestreadores deberán adoptar las medidas de profilaxis y seguridad personal, así como de desinfección de materiales utilizados para el muestreo. Ver documento SAG "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación", versión vigente.

La toma y envío de muestras debe ser realizada por el equipo de muestreo del Laboratorio Autorizado, el cual debe adjuntar las muestras a un Protocolo Oficial SAG, en cuyo documento debe señalar al menos la identificación de cada una de las muestras, la especie, la fecha y la hora de la recolección de éstas. El cómo tomar la muestra se indica en el documento del SAG "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación", versión vigente.

En el Cuadro N°1 se indican la cantidad de unidades de productos hortofrutícolas a tomar por muestra, las cuales deben ser extraídas desde una caja que sólo puede ser abierta por personal del equipo de muestreo del laboratorio autorizado. Se considera tomar 5 muestras por lote y especie, las cuales deberán ser colocadas en bolsas estériles que resistan el peso y manipulación de la muestra.

Para el caso de racimos de uva de mesa se considera que un racimo corresponde a una fruta grande.

En caso de hortalizas, se considera asimilar a la fruta fresca, la cantidad de unidades a tomar por muestra, de acuerdo a su tamaño. Sin embargo, cuando se trate de hortalizas de hoja, se debe considerar el tomar aproximadamente 500g por muestra.

Una vez tomada la muestra se debe almacenar a 2-8°C y enviar lo más pronto posible al Laboratorio, manteniéndose la cadena de frío hasta su recepción.

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y
DIAGNÓSTICO DE *SALMONELLA SPP.* EN PRODUCTOS
HORTOFRUTÍCOLAS DE EXPORTACIÓN**

Código: D-GF-CGP-PT-036
Versión:01

Nota: cuando se menciona tomar como muestra 500g, tanto para fruta fresca, fruta deshidratada u hortaliza, ésta es una medida aproximada. Para evitar contaminaciones o exceso de manipulación de la muestra, no se pesa en el proceso de toma de muestras.

Cuadro N°1. Tipo y cantidad de muestras a tomar para análisis microbiológico.

Producto	Observaciones	Unidades por muestra	Cantidad muestras
Fruta fresca	Frutos extra grandes, piña, melón, entre otros.	1-2 U	5
	Frutos grandes, Naranjas, Granadas, Uva de mesa, entre otros.	5-10 U	5
	Frutos de tamaño medio, ciruelas, damascos, duraznos, entre otros.	10 U	5
	Fruta de tamaño pequeño, arándano, frutilla, frambuesa, entre otros.	500g	5
Fruta deshidratada	Pasas, entre otros.	500g	5
Hortalizas	En caso de unidades compactas, asimilar, la cantidad por muestra, a la fruta fresca, de acuerdo a su tamaño.	1-2 U 5-10 U 10 U 500g	5
	En caso de hortalizas de hoja, tales como puerro, perejil, espinaca, entre otros.	500g	5

5.2 Incorporación como usuario al Sistema Informático SAG

El SAG incorporará al laboratorio autorizado como usuario del Sistema de Información de Sanidad Vegetal (SISVEG) u otro sistema informático que el SAG determine y le proporcionará los nombres de usuarios y las contraseñas correspondientes para la correcta gestión del ingreso de muestras, recepción, seguimiento de las muestras, ingreso de diagnósticos y autorización de los informes de laboratorio.

5.3 Traslado o envío de muestras

El despacho o traslado de la(s) muestra(s) será de responsabilidad del laboratorio autorizado a cargo del muestreo. Sin perjuicio de lo anterior, podrá utilizar los servicios de una empresa de transporte de encomiendas o courier reconocida a nivel nacional y establecida legalmente y que garantice el envío en el tiempo y las condiciones de temperatura adecuados (mantención de cadena de frío).

5.4 Recepción y manejo de la muestra

El ingreso de los datos de la muestra al sistema informático y su posterior recepción en el laboratorio, tanto física como documental, debe ser realizado en un plazo máximo de 1 día hábil, contado desde la fecha de muestreo.

Una vez recepcionada la muestra, el responsable técnico del laboratorio deberá evaluar la aptitud de la muestra para el análisis, considerándose como muestra apta, aquella que presenta temperatura de recepción en un rango entre 2-8°C y que se considera representativa en cantidad y tamaño. Si la muestra presenta condiciones de embalaje inadecuadas, no está separada por especie, no viene en la cantidad indicada en el Cuadro N°1, o no viene con la información adecuada, ésta debe ser rechazada. El mecanismo a seguir en caso de rechazo de la muestra es: ingresar al sistema, incorporar como diagnóstico el resultado NO APTA, indicar en observaciones el motivo de rechazo de la muestra, enviar a autorización y dejar disponible el informe de laboratorio.

Cada una de las 5 muestras tomadas por especie, debe ser considerada como una muestra individual.

El sistema informático del SAG emite, una vez recepcionada la muestra, una Orden de Análisis, la cual es un documento interno del laboratorio. Si el laboratorio utiliza un formato interno distinto, éste no deberá entregar la información de procedencia de la muestra u otra información que pueda influenciar al analista.

Nota: si ocurre que en el proceso de muestreo se toman menos muestras o menor cantidad de unidades o gramaje a la indicada en el Cuadro N°1, se debe dejar constancia y antecedentes que avalen tal situación, de modo que la muestra sea aceptada en el Laboratorio.

5.5 Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento no selectivo

En primera instancia las muestras se deben pesar en una balanza calibrada, sin abrir la bolsa, y agregar asépticamente Agua Peptonada Tamponada (APT) estéril en una relación 1:1 (1g/ml).

- Todo el contenido de la bolsa se homogeniza en agitador orbital o Stomacher, dependiendo del volumen de la muestra, por 15-20min.
- Traspasar 30ml a un frasco estéril y adicionarle 30ml de APT como caldo de pre-enriquecimiento.
- Incubar el caldo de pre-enriquecimiento (APT) a 37±1°C durante 16-22hrs.
- Se deben utilizar frascos diferentes para cada análisis de *Salmonella spp.* y *E. coli*.
- Para este tipo de análisis no se utilizarán contramuestras.

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

5.6 Metodología de diagnóstico

5.6.1 Test VIDAS EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05

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

5.6.1.1 Enriquecimiento selectivo

- Transferir 0.1±0.02 ml desde el frasco con APT con la muestra incubada, a un tubo con 10 ml de Caldo SX2.

- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella spp.* H₂S negativa y H₂S positiva), ambas en cada tubo de enriquecimiento respectivo.
- Incubar a 41.5±1°C durante 22–26 horas.

5.6.1.2 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.

5.6.1.3 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. Además, se debe efectuar una recalibración cada 14 días.
- Esta operación permite ajustar la curva de calibración a cada aparato y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo.
- El estándar, identificado por S1, será analizado por duplicado (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV ("Relative Fluorescent Value") fijados. Si no es así, la media no será memorizada: Repetir una calibración.

5.6.1.4 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.
- Teclar 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 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 (500µl) 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 por 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 500µl 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.

5.6.1.5 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 por 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 5.7.

Los **resultados no válidos** pueden aparecer cuando la lectura del ruido de fondo es superior a un umbral pre-determinado (indicando una contaminación del sustrato). En este caso, repetir el ensayo con la muestra inactivada o el reactivo en cuestión (S1, C1 o C2). Ver el manual del usuario para información complementaria.

5.6.1.6 Control de calidad

- Un control positivo y un control negativo se incluyen en cada caja de reactivos VIDAS[®] *Salmonella*.
- Los controles deben ser analizados inmediatamente después de la apertura de una nueva caja, con el fin de garantizar la ausencia de alteración de los reactivos.
- También es 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.

5.6.2 Test Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09

La descripción de esta metodología está basada en el Instructivo Técnico Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09. En caso de que se desarrollen nuevas versiones más avanzadas, éstas deben ser actualizadas por los laboratorios autorizados.

Previo a la realización del test asegúrese de contar con todos los reactivos vigentes y materiales necesarios para la realización de la prueba.

Delimite tres áreas de trabajo:

- Manipulación de los reactivos del kits.
- Manipulación de muestras y cepas control (gabinete de bioseguridad)
- Área donde colocar el equipo GDS.

Para la manipulación de reactivos se deben usar guantes estériles. Se debe tener la precaución de cambiarlos después de haber trabajado las muestras para evitar contaminación cruzada.

5.6.2.1 Realización del test

- Agite en vortex el **Reactivo de Concentración**. De esta manera las partículas quedan suspendidas en forma homogénea para ser dispensadas. Inmediatamente transfiera 20µl a cada pocillo (tiras de 8 unidades), de acuerdo al número de pruebas a realizar. Utilice una pipeta repetidora y puntas de 0,5ml. Cubra los pocillos con una tira de película adhesiva para proteger el contenido.
- Transfiera 0,5ml de Caldo Cerebro de Corazón (CCC) estéril en un pocillo para cada muestra y controles (tiras de 8 unidades) y reserve para la siguiente etapa. Utilice una pipeta repetidora con puntas estériles de 10ml. Cubra los pocillos con una tira de película adhesiva para proteger el contenido.
- Cuidadosamente remueva la película adhesiva de los pocillos que contienen el **Reactivo de Concentración** y agregue 1ml de la muestra incubada en APT (punto 5.5). La muestra tomada debe estar libre de material particulado. Debe ir cubriendo, con una tira de película adhesiva, los pocillos de las series de 8 análisis en la medida que se van completando para evitar contaminación entre muestras.
- Agite mediante vortex (GDS agitador vortex) la placa a aproximadamente 900rpm/10-20min. Colocar la placa cuidadosamente hasta que encaje mediante un sonido. Se puede ajustar las revoluciones utilizadas a fin de asegurar que la película adhesiva protectora no tome contacto con las muestras.
- Cuidadosamente retire y descarte las películas protectoras que cubren los pocillos de las muestras y de los pocillos con CCC.
- Cubra los extremos de los canales de la Pick-Pen con las fundas de silicona. Verifique que están firmemente adheridas. Extienda los magnetos presionando el botón naranja. Ajuste las fundas si se requiriese. Inserte los magnetos en la primera línea de pocillos y agite suavemente por 30seg, describiendo movimientos hacia arriba y abajo desde la superficie y fondo del pocillo. Suavemente toque el extremo de las puntas contra los bordes de los pocillos para impedir el escurrimiento de los líquidos.
- Transfiera con la Pick-Pen la muestra a cada pocillo con CCC. Con la punta sumergida dentro de cada pocillo, retraiga el magneto presionando el botón naranja, agite suavemente y retire la Pick-Pen. Elimine las cubiertas de silicona. Cubra los pocillos con la película protectora e incube a 37°C±1 por un período de 2-4hrs.
- Dispense 35µl de **Buffer de Resuspensión** en la microplaca de resuspensión de acuerdo al número de pruebas a realizar. Cubra con una película adhesiva protectora. Realice esta actividad un poco antes de que finalice el período de incubación de 2-4hrs a fin de asegurar que el contenido no se encuentre dispensado por un largo período de tiempo y se produzca desecación.
- Una vez terminada la incubación transfiera las partículas desde el CCC al tampón de resuspensión utilizando la Pick-Pen. Cubra hasta el siguiente paso.
- Cambie los guantes para manipular los reactivos.
- Enfríe el bloque de aluminio a 2-8°C al menos 20min antes de su uso. Coloque los tubos de amplificación en el bloque. Selle bien el envase para preservar los viales no utilizados.

- Abra las tapas de los tubos de amplificación y dispense 10µl de la polimerasa diluida con fecha vigente en cada uno utilizando una pipeta repetidora y una punta de 0,2ml. Este paso debe realizarse solo 15min antes de su uso.
- Transfiera 20µl de cada muestra y controles desde la placa de resuspensión hasta los tubos de amplificación usando una micropipeta multicanal. Asegúrese de no permitir la presencia de burbujas en el volumen transferido. Cierre firmemente las tapas.
- Antes de colocar los tubos en el carrusel del equipo GDS, invierta la placa con un brusco movimiento, verificando que se vea el contenido del vial en la tapa. Realice la operación inversa para devolver el contenido al fondo del tubo.
- Numere cada vial de las series de 4 y coloque en el carrusel.
- Todo el proceso realizado con las muestras debe realizarse también en las cepas control *Salmonella spp.* H₂S positivas y H₂S negativas, por tanto cada conjunto de muestras procesadas simultáneamente deberá registrar en su reporte los resultados de las cepas control.
- Opere el equipo de acuerdo a las indicaciones del manual y las entregadas en el curso de capacitación.
- Una vez terminada la corrida, retire los viales y elimine sin abrirlos para evitar la contaminación con productos de la amplificación. Para ello elabore un instructivo para desechar el material contaminado de acuerdo a la información proporcionada por el fabricante del kit.

5.6.2.2 Resultados e interpretación

Existen tres posibles opciones de resultados: **Positivo, Negativo y No Amplificado.**

- **Positivo:** La muestra es presuntiva positiva a *Salmonella spp.* Debe confirmarse.
- **Negativo:** La muestra es negativa a *Salmonella spp.*
- **No amplificado:** No ocurrió la amplificación. La muestra debe volver a analizarse a partir del CCC incubado o iniciar nuevamente el análisis a partir del APT incubada.

Los reportes entregados por el equipo deben ser respaldados en forma digital e impresos para ser archivados junto al protocolo de análisis como respaldo.

5.6.3 Microbiología Tradicional basada en ISO 6579

5.6.3.1 Enriquecimiento selectivo

- Utilizar para el enriquecimiento caldo Rappaport-Vissiliadis con Soya (caldo RVS) y caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobiacina (caldo MKTTn).
- Traspasar 0,1ml ± 0.02 ml desde el frasco con APT con la muestra incubada, a un tubo con 10 ml de caldo RVS. Incubar 41,5°C±1°C por 24 horas ±3 horas.
- Traspasar 1ml ± 0.2 ml desde el frasco con APT con la muestra incubada, a un tubo con 10 ml de caldo MKTTn. Incubar 37°C±1°C por 24 horas ±3 horas.
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella spp.* H₂S negativa y H₂S positiva), ambas en cada tubo de enriquecimiento respectivo.

5.6.3.2 Desarrollo del test

En este caso, como no se utiliza un método screening de análisis, todas las muestras deben ser analizadas de acuerdo al procedimiento descrito del punto 5.7.1 en adelante.

5.7 Confirmación

En el caso del método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05, 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.

En el caso del método Screening GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09 la confirmación mediante test bioquímicos y antígenos somáticos, deberá realizarse a partir de las muestras incubadas en el caldo de pre-enriquecimiento (APT), las que deben estar mantenidas hasta el momento de la confirmación a 2-8°C por 48hrs antes de ser traspasadas a los caldos de enriquecimiento, según descripción del punto 5.6.3.1. Luego continuar el proceso según lo indicado en el punto 5.7.1.

5.7.1 Aislamiento en agar selectivo

- Agitar los tubos de Enriquecimiento, utilizando el agitador o Vortex.
- Introducir el asa de aro en el interior del tubo y con abundante inóculo, sembrar por agotamiento sobre:
 - Agar XLD y un segundo Agar complementario para *Salmonella spp.* En el caso de Microbiología Tradicional basada en ISO 6579:2002 o confirmación del Método Screening GDS Salmonella.
 - Agar SM2 chromID Salmonella y un segundo Agar complementario para *Salmonella spp.* En el caso de Método Screening VIDAS®.
- No subdividir las placas. Identificar las placas sembradas.
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella spp.* H₂S negativa y H₂S positiva), ambas en los dos medios selectivos.
- Incubar las placas a 37±1°C o de acuerdo a la información del fabricante del medio empleado.
- Examinar las placas dentro de 18 a 24hrs. Seleccionar 1 a 5 colonias de acuerdo a la presentación característica de las colonias de *Salmonella spp.* en cada agar. Las colonias a confirmar deben ser marcadas e identificadas para tener trazabilidad a los resultados de la identificación bioquímica y serológica.
 - SM2 *chromID* Salmonella: colonias rosadas a malva, de apariencia lisa y de bordes netos.
 - Agar XLD: colonias negras o rojas con o sin centro negro. El borde o margen de la colonia podría permanecer amarillo dentro de las 24 horas, posteriormente debería virar a rojo.
 - Otro medio complementario: de acuerdo a las características indicadas por el fabricante.
- 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.

5.7.2 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 spp.*
- Inocular cada una de las colonias en TSI, LIA, MIO y TSA. Para la metodología basada en ISO 6579:2002, además de las pruebas bioquímicas anteriores, se deben realizar las pruebas Urea, VP (Voges Proskauer) 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 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 a confirmación del aislamiento.
- Incubar todos los medios utilizados para la batería bioquímica a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 hrs.

Nota: Para el método VIDAS[®], en caso de resultados discordantes, se recomienda seguir el siguiente protocolo adicional: transferir 0,1ml de caldo enriquecimiento en 10ml de caldo RVS, incubar 18-20hrs a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$, aislar sobre agares selectivos.

5.7.2.1 Interpretación de las pruebas bioquímicas

Cuadro N°2: Interpretación de las pruebas bioquímicas

Medio	Prueba	Resultado
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 ₂ S	Produce H ₂ S: 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.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y DIAGNÓSTICO DE *SALMONELLA SPP.* EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-036
Versión:01

	Producción de H ₂ S	Produce H ₂ S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable). No produce H ₂ S: Sin cambios.
	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.
	Descarboxilación de la Ornitina	Descarboxila la ornitina: Coloración azul, de intensidad variable. No descarboxila la Ornitina: Coloración amarilla.
	Producción de Indol ¹	Produce Indol: Formación de un anillo rojo o rosado al agregar Reactivo de Kovacs. No produce Indol: Anillo de color amarillo.
Agar urea	Actividad de la Ureasa	Si la reacción es positiva se libera amonio desde la Urea, con lo cual cambia de color el indicador (rojo fenol) desde un color rosa a un fucsia profundo.
Disco ONPG	Detección de β-Galactidosa.	Positivo: observación de color amarillo en la suspensión. Negativo: la suspensión permanece sin cambio de color.
Caldo R.M.V.P. Reacción de Voges Proskauer ²	Fermentación de la glucosa	La formación de un color rosa a rojizo dentro de 15min indica una reacción positiva.

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

2: Después de la incubación, agregar 2 gotas de solución de creatina, 3 gotas de solución de α-naftol y 2 gotas de hidróxido de potasio al 40%. Luego mezclar.

Cuadro N°3: Resultado de las Pruebas Bioquímicas

Agar TSI			Agar LIA			Agar MIO			Agar Urea	ONPG	VP	Microorganismo
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	GAS	H ₂ S	Mov	Indol	Orniti na				
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</i> Typhi

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y DIAGNÓSTICO DE *SALMONELLA SPP.* EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-036
Versión:01

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

* Puede dar reacciones similares.

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

5.7.3 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 spp.*, de acuerdo a lo descrito en Punto 5.7.2.1 Cuadro N°3.
- 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 spp.* Posteriormente, para identificar el **serogrupo**, se debe repetir el procedimiento descrito anteriormente, realizando aglutinaciones con los sueros monovalentes somáticos, desde el grupo A hasta el I.
- Si la cepa **NO aglutina** con ningún suero monovalente somático y posee pruebas bioquímicas características de *Salmonella spp.*, debe continuarse con la serología flagelar.

5.7.4 Confirmación basada en la identificación del antígeno polivalente 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.

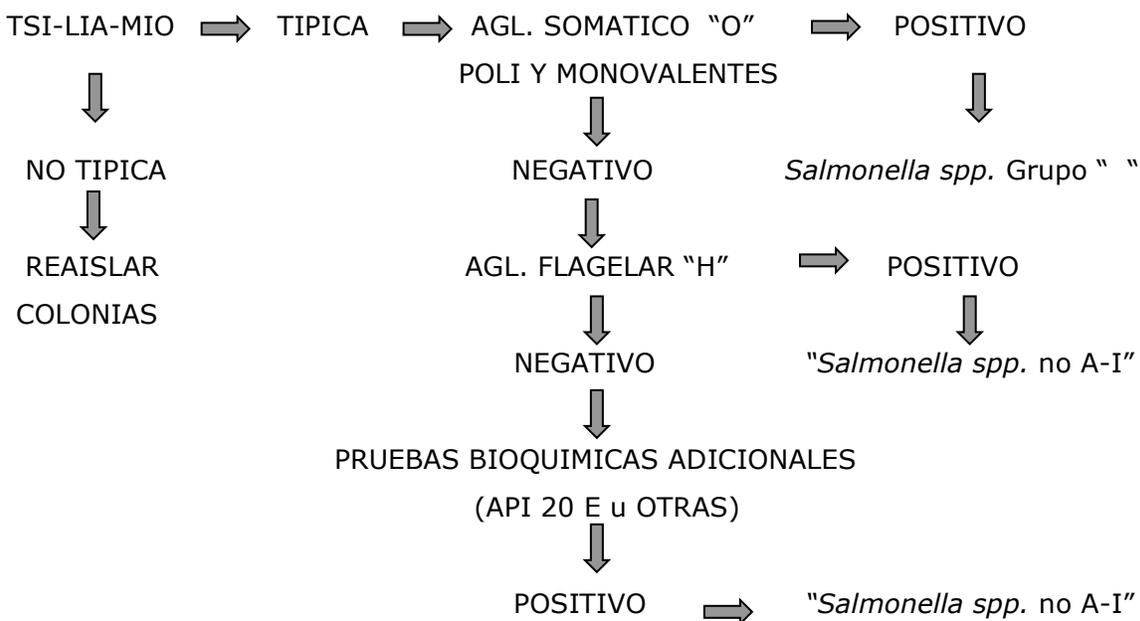
- Incubar ambos tubos a $48^{\circ} - 50^{\circ}$ C en baño de agua hasta 1 hora. Evitar agitarlos en exceso.
- Sacar los tubos del baño termostático evitando agitarlos en exceso antes de efectuar la lectura de la reacción.
- Efectuar la lectura del tubo utilizado como control de autoaglutinación para 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.

5.8 Cálculo y expresión de los resultados

- Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella spp.* y si las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente y monovalente son positivas, se informa como **Presencia de *Salmonella spp.* Grupo " "**.
- Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella 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 después de seguir el flujograma descrito en el Esquema 1, 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 spp.* 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 spp.***
- En caso de *Salmonella spp.* positiva, una vez que se haya seroagrupado 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 Instituto de Salud Pública 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.
- Los costos involucrados en los análisis realizados por el Instituto de Salud Pública serán financiados por el Laboratorio Autorizado.

Esquema 1: Pruebas bioquímicas y serológicas



5.9 Variación de la metodología

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación, por parte del Servicio, otras metodologías diferentes a las indicadas en este instructivo, las que deben poseer respaldo de validación internacional de acuerdo al Protocolo descrito en la ISO 16140. Una vez evaluadas y aprobadas por el Servicio, en relación a la verificación interna del método efectuada por el laboratorio a autorizar y a la competencia de sus analistas, podrán ser implementadas por los laboratorios autorizados.

6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos del análisis de muestras deberán ser ingresados al sistema de información de sanidad vegetal SISVEG u otro sistema informático que el SAG determine, en un plazo máximo de 10 días, desde la fecha de recepción de la(s) muestra(s) por parte del laboratorio autorizado.

Cualquier atraso en el tiempo de respuesta, deberá ser informado por el responsable técnico del laboratorio autorizado, con 2 días hábiles de anticipación a la fecha límite de respuesta, vía correo electrónico, al Supervisor del SAG Lo Aguirre.

La autorización de resultados, en el sistema, será por parte del responsable técnico del laboratorio autorizado, quien los dejará disponibles para el sistema en caso de ser negativos, o en calidad de Reservados, en caso de ser positivos a *Salmonella spp.*

Los informes de resultados con muestras negativas a *Salmonella spp.* pueden ser impresos o almacenados como archivo digital y deberán ser informados y enviados al contratante del servicio.

Los informes con muestras positivas a *Salmonella spp.* deben ser informados en un plazo máximo de 1 día hábil, vía correo electrónico, al Supervisor del SAG Lo Aguirre. Estos Informes tienen el carácter de confidencial entre el laboratorio autorizado y el SAG y no pueden ser impresos o almacenados como archivo digital, y tampoco pueden ser enviados o informados al contratante del servicio de las muestras. En caso de no respetarse lo anterior, sin previa autorización del Servicio, será considerado como una no conformidad crítica y causal de suspensión inmediata de la autorización. La liberación del Informe de Laboratorio, con resultado positivo, solo podrá realizarse cuando el Supervisor del SAG Lo Aguirre así lo instruya, procediendo el responsable Técnico a ingresar al SISVEG u otro sistema informático definido y dejando el diagnóstico disponible.

7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

Todo laboratorio autorizado será supervisado mediante visitas de auditorías de seguimiento al menos una vez al año. El Servicio podrá realizar auditorías adicionales cuando lo estime conveniente. Asimismo, podrá recibir supervisiones del personal del SAG de regiones o del Nivel Central, durante la ejecución del muestreo.

La respuesta a las No Conformidades y Observaciones encontradas durante la Auditoria, deberán ser contestadas por el Laboratorio Autorizado, en un plazo no superior a 10 días hábiles desde la recepción del informe de auditoria emitido por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias.

La renovación de la autorización quedará supeditada a la emisión de un informe, 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.

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o el personal del SAG que supervise las actividades de muestreo, detectan faltas en el desempeño del laboratorio autorizado, consideradas como no conformidades críticas, el SAG, de acuerdo con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al laboratorio autorizado, mediante una carta suscrita por el/la Jefa del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o un Director/a Regional o un Jefe/a de Oficina, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización.

El laboratorio autorizado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales y/o internacionales, en el momento que el Servicio lo requiera y poner a disposición la información que corresponda.

8 OBLIGACIONES

Sin perjuicio de las obligaciones estipuladas en el capítulo VII del Reglamento específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos, el laboratorio autorizado deberá cumplir con lo siguiente:

- No podrá ejercer como laboratorio autorizado 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 u otras que determine el Servicio.
- Ante cualquier modificación de infraestructura, personal, procedimientos o equipamiento, el Laboratorio autorizado deberá solicitar su evaluación por escrito a la(el) Jefa(e) Departamento Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros del SAG. Solamente una vez autorizada la modificación, ésta podrá ser realizada.
- En caso de que la metodología de diagnóstico requiera ser actualizada, ya sea por variaciones de la técnica o insumos de la misma, el Servicio informará oficialmente a los laboratorios autorizados, la necesidad de realizar las modificaciones correspondientes, dándose un plazo máximo de 2 meses para ser realizadas.

9 FORMULARIOS

- Formulario de identificación de personal que conforma equipos de muestreo, del Responsable Técnico, Subrogante Técnico, y de analista(s) del laboratorio vinculado(s) al diagnóstico.
- Formulario anexo para el diagnóstico de *Salmonella spp.* en productos hortofrutícolas de exportación.

**FORMULARIO DE IDENTIFICACIÓN DEL PERSONAL
VINCULADO AL ANÁLISIS DE *SALMONELLA SPP.***

Código: F-GF-CGP-PT-154
Versión:01

Identificación del Laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Personal para las labores de muestreo:

<u>Nombre completo</u>	<u>N° de cédula de identidad</u>	<u>Cargo (Jefe equipo/apoyo)</u>	<u>Firma</u>

Identificación del analista(s):

<u>Nombre completo</u>	<u>N° de cédula de identidad</u>	<u>Cargo (Responsable Técnico/Analista)</u>	<u>Firma</u>

Firma del postulante o su representante legal

Fecha recepción SAG:.....

Identificación del Laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Marcar con una X el o los análisis para los cuales solicita la autorización:

Análisis a los que postula	
1. Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 y confirmación bioquímica y serológica.	
2. Método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09 y confirmación bioquímica y serológica.	
3. Microbiología Tradicional basada en ISO 6579 y confirmación bioquímica y serológica.	

Firma del postulante o del representante legal

Fecha: