	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------

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




	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p align="center">Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p align="right">Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	---	--

TABLA DE CONTENIDOS

1	OBJETIVOS Y ALCANCE	4
2.	REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	4
3.	DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	4
4.	REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN.	5
4.1	Requisitos del Personal	5
4.1.1	Responsable Técnico:	5
4.1.2	Analistas:	6
4.2	Requisitos de Infraestructura, Equipos, Materiales Reactivos y Medios de Cultivo.	6
4.2.1.	Equipos, instrumentos y materiales	6
4.2.2	Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo	7
4.2.3	Estándares	8
4.3	Requisitos Específicos	8
4.4	Medios de Verificación de Requisitos	9
4.4.1	Solicitud de Autorización	9
5.	ANÁLISIS/ENSAYO	11
5.1	Captación y Envío de la Muestra	11
5.2.	Recepción y Manejo de la Muestra	12
5.3	Metodología	12
5.3.1	Preparación de muestras y Preenriquecimiento No Selectivo	12
5.3.2	Enriquecimiento Selectivo	13
5.3.3	Aislamiento en Agar Selectivo	13
5.3.4	Interpretación de las Pruebas Bioquímicas	14
5.3.5	Cuadro Interpretación de las Pruebas Bioquímicas	15
5.3.6.	Confirmación basada en la identificación de antígenos somáticos (O) de <i>Salmonella</i> .	17
5.3.7	Confirmación basada en la identificación de antígeno flagelar (H) de <i>Salmonella</i> .	17
5.4	Expresión de los resultados	18
6.	REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS	19

	SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile	Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.	Código: D-ATR-AAT-24 V 02
---	---	---	------------------------------

7. SUPERVISIÓN A LABORATORIOS AUTORIZADOS	19
8. OBLIGACIONES	20
9. FORMULARIO	21


	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p align="center">Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	---	--------------------------------------

1 Objetivos y Alcance


El objetivo del instructivo es dar a conocer los requisitos específicos para la autorización de laboratorios por parte del SAG para la realización del análisis/ensayo para el diagnóstico de ***Salmonella spp.*** móviles según Método Tradicional de Cultivo descrito en el manual OIE, versión 2018, a partir de muestras provenientes de planteles comerciales de aves adscritos al Programa de Vigilancia de *Salmonella spp.* Versión vigente.

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

2. Referencias y Documentos Relacionados

- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002. Directrices para la aplicación de NCh-ISO 17025 en los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97. Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones - Parte 1: Análisis físico-químicos y microbiológicos en procesos industriales.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Versión vigente.
- Manual de Técnicas Diagnósticas y vacunas de animales terrestres, OIE. Chapter 3.9.8. Edición, 2018
- ISO 11133:2014 "Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media" o Norma Chilena equivalente. Versión vigente.
- ISO 6579-1:2017, "Microbiology of food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella spp.*".
- Programa de Vigilancia de *Salmonella spp.* Versión vigente.
- Resolución Exenta Nº 90 de 2014, del Servicio Agrícola y Ganadero. Aprueba el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo o la que lo reemplace.
- Resolución 3571 de 2020, que aprueba el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros o la que lo reemplace. 
- ISO 16140-3: 2021 "Microbiology of the food chain –Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory".
- Instructivo Técnico para la Colecta y Envío de Muestras de Aves para Diagnóstico de Laboratorio. Versión vigente.

3. Definiciones y Abreviaturas

	SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile	Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.	Código: D-ATR-AAT-24 V 02
---	---	---	------------------------------

AL	Analistas de laboratorio
MVL	Médico Veterinario Laboratorio
Protocolo Oficial	"Registro de protocolo oficial" :Documento emitido por el Médico Veterinario Oficial del SAG o Médico Veterinario Autorizado.
SAG	Servicio Agrícola y Ganadero.
Laboratorio Oficial	Laboratorio Perteneciente al Servicio Agrícola y Ganadero.
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal.
MVO	Médico Veterinario Oficial del SAG.
MVA	Médico Veterinario Autorizado.
INN	Instituto Nacional de Normalización.
ISO	International Organization for Standardization.
SSA	Sistema de Sanidad Animal.
RPOA:	Registro Protocolo Oficial Aves

4. Requisitos para la Autorización.


4.1 Requisitos del Personal

Las personas jurídicas interesadas en postular a la autorización en esta área, deben cumplir con todo lo establecido, tanto en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, convenio de autorización, Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo como lo definido en el presente Instructivo Técnico. Además, deberá contar con servicios permanentes de profesionales capacitados y competentes para la Detección de *Salmonella spp.* según Metodología OIE (2018).

4.1.1 Responsable Técnico:

Según lo dispuesto en el número 4.2 del Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios Análisis/Ensayo, el Laboratorio debe contar con un responsable técnico, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado, el cual debe cumplir con los siguientes requerimientos.

- Poseer título profesional universitario otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera profesional del área Biológica. En caso de título obtenido en el extranjero, éste debe estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Haber recibido capacitación en la realización del método ***Salmonella spp.* Mediante Método Tradicional de Cultivo**, según OIE 2018, en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la autorización comprobada mediante certificado correspondiente.
- Tanto el personal técnico y/o profesional calificado debe estar capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p align="center">Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p align="right">Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	---	--

- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar, a través de la ejecución de un número de muestras positivas y negativas.

El responsable técnico debe tener un subrogante, el que debe cumplir con los mismos requisitos indicados anteriormente.

4.1.2 Analistas:

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

- Contar con título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización.
- Haber recibido capacitación en la realización del método ***Salmonella spp. Mediante Método Tradicional de Cultivo***, según OIE 2018. en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la autorización comprobada mediante certificado correspondiente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar, a través de la ejecución de un número de muestras positivas y negativas.

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

4.2 Requisitos de Infraestructura, Equipos, Materiales Reactivos y Medios de Cultivo.


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

Equipamiento básico para realizar las actividades comprendidas en el alcance de la autorización, de acuerdo a requisitos señalados en NCh-ISO 17025. Versión vigente.

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

4.2.1. Equipos, instrumentos y materiales


- Balanza digital.
- Estufa de cultivo 37° ± 1°C.
- Estufa de cultivo 41.5° ± 0.5 °C.
- Agitador de tubos o vortex.
- Asas desechables estériles
- Autoclave.
- Stomacher

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p align="center">Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	---	--------------------------------------

- Refrigerador.
- Gabinete de Bioseguridad. Clase II.
- Gotarios estériles desechables.
- Pipetas estériles de 1 y 5 ml.
- Guantes desechables estériles.
- Asa de nicrom de aro y asa en punta.
- Placas de vidrio para aglutinación.
- Lámpara o lupa con luz.
- Placas Petri plásticas desechables.
- Tubos de ensayo 13 x 10 mm.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Bolsas plásticas resellables, estériles para stomacher.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras y pinzas.
- Baño Termoregulado.

4.2.2 Reactivos, Soluciones y Medios de Cultivo

- Agua Peptonada Tamponada. Frasco Schott x 225 ml.
- Caldo Selenito Cistina Doble Concentración (CSCDB).
- Caldo soya tripticasa o triptosa.
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) con novobiocina (15.6 mg/L).
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).
- Agar Tripticasa Soya (TSA).
- Agar nutritivo
- Agar Citrato de Simmons
- Caldo RM-VP
- Solución α naftol
- Solución KOH al 40%
- Reactivo de Kovacs
- 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 para preparación de medios de cultivo.
- Solución de suero fisiológico al 0.85%.
- Solución de suero fisiológico al 0.85% con formalina al 0.6%.
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1%.
- Test Aglutinación en Látex (Oxoid©).
- Formalina.

	Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.	Código: D-ATR-AAT-24 V 02
--	---	------------------------------

NOTA: La preparación de los medios de cultivo mencionados anteriormente debe ser de acuerdo a lo señalado en ISO 6579-1:2017, "Microbiology of food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella spp.*".

4.2.3 Estándares

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

4.3 Requisitos Específicos

Los laboratorios, deben contar con un sistema de aseguramiento de la calidad implementado, siguiendo las directrices de la Norma ISO 17.025, versión vigente.


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 o por otra entidad Internacional acreditadora para la Norma ISO 17.025, versión vigente, reconocida por la International Organization for Standardization.

Una vez que el laboratorio solicitante obtenga la autorización de las técnicas por el SAG, se le otorgará un plazo de 2 años para lograr la acreditación de éstas ante el INN en la Norma Chilena ya referida.

El Laboratorio deberá indicar su capacidad diagnóstica, señalando el número de muestras que ejecuta por análisis y cantidad de analistas competentes para este alcance.

El Laboratorio deberá presentar la documentación necesaria que avale la verificación interna efectuada para la metodología señalada en el presente instructivo. La verificación debe incluir los parámetros técnicos descritos en la norma ISO 16140-3, versión vigente.

El laboratorio debe contar con los siguientes documentos:

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------


- Procedimiento/Instructivo Manejo de muestras involucrados en el alcance de autorización.
- Procedimiento e Instructivos Preparación de Medios de cultivo involucrados en el alcance de autorización.
- Procedimiento/Instructivo Preparación y Esterilización de Material de vidrio.
- Procedimiento/Instructivo Eliminación y Descontaminación de Residuos y Materiales.
- Procedimiento/Instructivo Aseo y Limpieza de Laboratorios
- Procedimiento/Instructivo Control Biológico de Esterilidad en Autoclaves
- Procedimiento/Instructivo de Verificación de Equipos
- Procedimiento/Instructivo Control de 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 Autorización
- Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de autorización
- Programa de Mantenimiento/Verificación/calibración de los equipos involucrados en el alcance de autorización.
- Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales.
- Demostración de competencia en la metodología a autorizar para todo el personal del alcance. El informe debe incluir número de análisis positivos y negativos realizados por cada analista, Responsable técnico y su subrogante, incluyendo el proceso de confirmación.
- El cumplimiento de estos requisitos será confirmado por el Servicio en la revisión documental del proceso de postulación y en la auditoría de verificación o por los medios que considere idóneos para tal efecto.

4.4 Medios de Verificación de Requisitos

4.4.1 Solicitud de Autorización

El laboratorio postulante deberá presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad, implementado en el laboratorio y que demuestren la acreditación en la NCh-ISO 17025. Versión vigente ante el INN, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos.

Algunos de los formularios citados se encuentran en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo.


	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de autorización (F-GF-CGP-PT-068), además de los antecedentes establecidos en resolución 3571 de 2020, que aprueba el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG en este capítulo.

Cuando se trata de la primera autorización de laboratorios, se debe presentar el dossier legal según lo establecido en el Reglamento específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, junto con el dossier técnico. Cuando se trata de una ampliación de alcance, solo es necesario presentar el dossier técnico. En relación a este último, la documentación a presentar es la siguiente:

Dossier Técnico (obligatorio):

- Documentación indicada en el Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo.
- Pagar la tarifa correspondiente a la etapa 1 y cuando sea aceptado, deberá pagar la tarifa correspondiente a la etapa 2.
- Documentación que demuestre la capacitación y competencia técnica del responsable técnico, su subrogante y de los analistas involucrados en la técnica del alcance de autorización, según lo descrito en el numeral 4.1 de este Instructivo.
- Lista Responsables Técnicos (Titular y subrogante) y de los analistas vinculados a la(s) técnica(s) del alcance de la autorización, de acuerdo al formulario F-ATR-AAT-263 de este Instructivo. El listado debe incluir a todo el personal a autorizar en el análisis/ensayo.
- Currículo del Responsable Técnico, su subrogante y de los analistas, involucrados en el alcance de autorización.
- Certificado de título del Responsable técnico, su subrogante y de los/los analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Copia del manual de aseguramiento de la calidad del laboratorio, si su sistema de aseguramiento de la calidad lo posee.
- Organigrama de personal, indicando los nombres, profesión y cargos del responsable técnico titular, su subrogante y de los analistas participantes en el análisis/ensayo autorizado.
- Copia simple del plano del laboratorio, donde se identifiquen las áreas del laboratorio y los accesos y ubicación de equipos, indicando flujo entre áreas limpias y sucias. Especial énfasis en las áreas físicas relacionadas con la autorización, incluyendo áreas de recepción de muestras, de realización de análisis, áreas de incubación, de descontaminación, bodegas de insumos y áreas de almacenamiento de medios de cultivo y materiales de referencia.

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p align="center">Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	---	--------------------------------------

- 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.
- Documentos que acrediten la capacitación tanto de él/el responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Procedimientos y/o Instructivos específicos e informes de verificación de método y de competencia técnica del personal, señalados en los numerales 4.1 y 4.3 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 y a uno o más analistas identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica.

El Dossier Técnico presentado para la postulación debe incluir toda la información solicitada en los numerales 4.1; 4.2 y 4.3 del presente Instructivo. La falta de algún documento, ocasionará el rechazo de la postulación, lo cual será comunicado al postulante, por el Departamento de Transacciones Comerciales y Autorización de terceros vía correo electrónico.

5. Análisis/Ensayo


5.1 Captación y Envío de la Muestra

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

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

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

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

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------

- Las muestras deben ser recolectadas asépticamente y antes de comenzar cualquier tratamiento con antibióticos, lo cual debe estar señalado en el Protocolo oficial SAG.
- Todo el proceso es generado e informado mediante la plataforma <http://sanidadanimal.sag.gob.cl/>.
- La generación del Registro de Protocolo animal Oficial es realizada por el médico veterinario autorizado u oficial.

El sistema genera un número de protocolo único que debe ir señalado por fuera de la caja isotérmica.

5.2. Recepción y Manejo de la Muestra

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

- Integridad de las muestras.
- Cantidad suficiente de muestras para el análisis.
- Identificación adecuada
- Deben venir refrigeradas y que no excedan las 36 horas desde su recolección.
- Temperatura de las muestras al momento de recepción (Rango aceptado: 2° a 8 °C).
- Material de envase adecuado (Bolsas estériles bien selladas, frascos con cierre que impida el extravasado de líquidos, etc.)
- Material refrigerante sin ruptura ni con extravasación de contenido.
- Contenedor isotérmico con sello SAG intacto.

5.3 Metodología

5.3.1 Preparación de muestras y Preenriquecimiento No Selectivo

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


Para muestras de fecas y tómulas de arrastre remitirse al "Instructivo Técnico de Análisis/Ensayo para la Detección de *Salmonella spp.* (Móviles) en fecas animales según Método Tradicional ISO 6579-1:2017(E).

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

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

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

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

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------

5.3.2 Enriquecimiento Selectivo

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

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

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

5.3.3 Aislamiento en Agar Selectivo

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

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

5.3.3.1 Selección de colonias para Pruebas Bioquímicas

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

Si las colonias seleccionadas no se encuentran aisladas y puras, se deben estriar en la superficie de placas con XLD previamente secadas, de manera que se permita el desarrollo de colonias aisladas. Incubar las placas inoculadas a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 3 horas.


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

Usar cultivos puros para la confirmación bioquímica y serológica.

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

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

Al momento de tomar el inóculo evitar tocar con el asa el agar, ya que los medios altamente selectivos suprimen el crecimiento de algunos organismos que pueden estar presentes.

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------

Incubar todos los medios utilizados para la batería bioquímica a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 ± 3 hrs.

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

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

5.3.4 Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

5.3.4.1 Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

- Fermentación de la glucosa
 - Fermenta la glucosa: Fondo Amarillo (A).
 - No fermenta la glucosa: Fondo rojo (K).
- Fermentación de la lactosa y/o sacarosa
 - Fermenta estos azúcares: Tendido Amarillo (A).
 - No fermenta: Tendido rojo (K).
- Producción de gas
 - Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
 - No produce: Sin cambios.
- Producción de H₂S
 - Produce H₂S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
 - No produce: Sin cambios.

5.3.4.2 Agar Hierro Lisina (LIA)


- Descarboxilación de la lisina
 - Descarboxila la lisina: Fondo y tendido púrpura (K/K).
 - No descarboxila la lisina: Fondo amarillo (A).
- Producción de gas
 - Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
 - No produce gas: sin cambios.
- Producción de H₂S
 - Produce H₂S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
 - No produce H₂S: Sin cambios.
- Desaminación de la lisina
 - Desamina la lisina: Tendido rojo (R).
 - No desamina: Tendido púrpura (K).

5.3.4.3 Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO)

Movilidad

Los microorganismos inmóviles sólo crecen en la línea de siembra y los móviles se reconocen por su desarrollo difuso alejado de la línea de inoculación.

- Producción de Indol
 - Produce Indol: Formación de un anillo rojo o rosado al agregar Reactivo de Kovacs.
 - No produce Indol: Anillo de color amarillo.

	SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile	Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.	Código: D-ATR-AAT-24 V 02
---	---	---	------------------------------

5.3.4.4 Descarboxilación de la Ornitina

- Descarboxila la ornitina: Coloración azul, de intensidad variable.
- No descarboxila la ornitina: Coloración amarilla.

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

5.3.4.5 Prueba Rojo de Metilo (RM).

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

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

5.3.4.6 Prueba Voges Proskauer (VP)

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

- Reacción positiva: Desarrollo de coloración rosada.
- Reacción negativa: Color café pardo.

5.3.4.7 Prueba de Citrato

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

- Reacción positiva: viraje del color verde a azul.

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

5.3.5 Cuadro Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

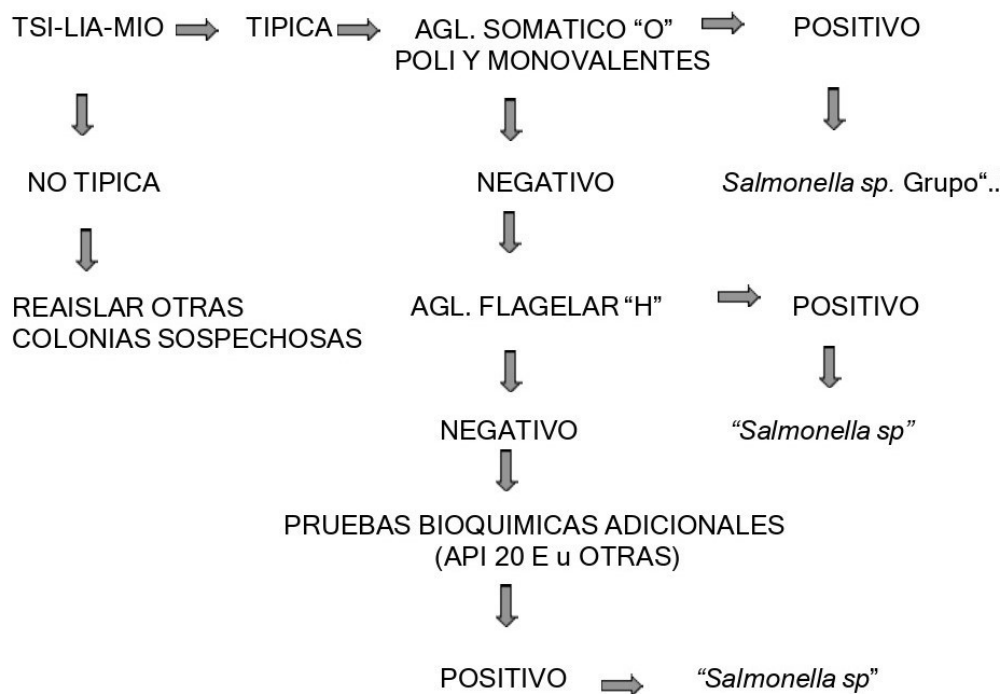
Agar TSI			Agar LIA			Agar MIO			Microorganismo
TSI	GAS	H ₂ S	LIA	GAS	H ₂ S	Mov.	Indol	Ornitina	
K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	<i>Salmonella</i> subespecie I Otras <i>Salmonella</i>
K/A	-	-	K/K	+	-	+	-	+	<i>S. Choleraesuis</i> Otras <i>Salmonella</i>
K/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	<i>Salmonella</i> Typhi
K/A	+	-	K/A	+	-	+	-	+	<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> subesp. 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.

5.3.5.1 Esquema de pruebas bioquímicas y serológicas.



	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------

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

Se someten a confirmación serológica todas las colonias que cumplan con las pruebas bioquímicas características para el género *Salmonella spp.*, de acuerdo a lo descrito en Punto **5.3.5**.

Se ocupa uno de los tubos de agar tripticasa soya (TSA) inoculados junto a la batería bioquímica. Se suspende el cultivo con aproximadamente 3 a 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 de suero somático polivalente A-I. Como control agregar solamente una gota de suspensión del cultivo para detectar si se produce **autoaglutinación** de la cepa estudiada.

Mezclar con asa desechable.

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

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

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

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


Si la cepa no aglutina con el suero polivalente (A-I), puede deberse a la presencia de cápsula, por lo cual debe hervirse 15 minutos a una hora en baño de agua (tiempo que puede tardar en romper la cápsula). Después se debe confrontar nuevamente una gota del suero polivalente con una gota de suspensión del cultivo tratado por calor.

Si las cepas aglutinan con el suero polivalente, corresponden al género *Salmonella 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.

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

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

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------

Adicionar al CTS inoculado, 5 ml de solución salina que contenga 0,6% de formalina y dejar reposar 1 hora. En dos tubos distribuir 1 ml de esta preparación (se coloca 0,5 ml en cada tubo).

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

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

Preparación de la dilución de trabajo para el antisuero flagelar H, polivalente A-Z BD DIFCO: se utiliza en una dilución 1:25. Añadiendo 0,1 ml de antisuero reconstituido a 2,5 ml de solución de Na Cl al 0,85 %. Realizar esta dilución al momento de su uso. Al mezclar cantidades iguales de antisuero diluido y aislado de prueba, la dilución final es de 1:100.

El otro tubo usarlo como control de autoaglutinación.

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

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

Efectuar la lectura en el tubo de autoaglutinación para verificar la presencia de flóculos. Si esta reacción es positiva, la prueba de aglutinación no es válida por tanto no proceda a la lectura del tubo de prueba. Si no hay evidencia de floculación en el tubo, proceda a la lectura del tubo de prueba.

En el tubo de prueba observe la presencia o ausencia de flóculos. Su presencia indica un resultado positivo. Su ausencia indica un resultado negativo.

Opcionalmente, se puede usar el Test de Látex para Salmonella de Oxoid (seguir las instrucciones del fabricante).

Registrar presencia o ausencia de aglutinación.


5.4 Expresión de los resultados

Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella* y si las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente y monovalente son positivas, se informa como **Presencia de *Salmonella spp.* 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 spp.*"**.

Si después de seguir el flujograma descrito en el Punto **5.3.5.1** la aglutinación con el antisuero polivalente flagelar no ocurre, se deben realizar pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por el API 20 E. Si el resultado de estas pruebas es positivo, se informa como **Presencia de "*Salmonella spp.*"**.

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

	<p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	--	--	--------------------------------------

Una vez que se haya seroagrupado la cepa y su resultado corresponda a los serogrupos B y D, el responsable técnico del Laboratorio Autorizado debe realizar el envío de éstas al Departamento Red SAG de Laboratorios.

Si la cepa diagnosticada corresponde a otro serogrupo, el responsable técnico del Laboratorio Autorizado, debe consultar al MVA responsable de la muestra, si el serogrupo diagnosticado ha sido detectado previamente en el sector de origen, durante el año/calendario en curso. El laboratorio autorizado debe recibir esa respuesta dentro de 72 horas.

Si el MVA informa que corresponde a un serogrupo nuevo para el sector muestreado, el Laboratorio Autorizado debe realizar la serotipificación de la cepa mediante metodología automatizada Check and Trace o equivalente (Luminex X MAP-R. *Salmonella* serotyping) y adicionalmente se debe enviar la cepa para confirmación al Departamento Red SAG de Laboratorios. (Ver anexo 9.2)

6. Registro y Envío de Resultados

El ingreso de resultados lo realiza el Laboratorio autorizado en la plataforma en línea (SSA). <http://sanidadanimal.sag.gob.cl/>.

Los resultados serán validados y disponibles para los MVA, MVO, Laboratorio autorizado, Laboratorio Oficial SAG y División de Protección Pecuaria.

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


El laboratorio autorizado debe generar el protocolo de derivación de la cepa al Laboratorio oficial SAG, seleccionando la técnica **Serotipificación** en el Sistema de Sanidad Animal (SSA). Acompañando la cepa y el RPOA, se debe enviar adjunta la información de los resultados de las pruebas bioquímicas e identificándola con el número de muestra consignado en el Protocolo Oficial original.

El laboratorio oficial SAG realizará la tipificación mediante metodología Kauffman- White Le Minor a las cepas de *Salmonella spp.* despachadas e informará al laboratorio autorizado el resultado obtenido mediante el Sistema en línea (SSA).

7. Supervisión a Laboratorios Autorizados

De conformidad con lo señalado en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, Convenio de autorización y el presente instructivo técnico; todo laboratorio autorizado deberá ser supervisado por el SAG, a través una visita de supervisión al año a las dependencias del laboratorio.

Una vez realizada la visita de supervisión, se generará un informe, el que indicará las no conformidades y observaciones encontradas, las que deben ser respondidas por el laboratorio autorizado en los plazos estipulados en dicho informe.

 <p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p align="center">Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.</p>	<p align="right">Código: D-ATR-AAT-24 V 02</p>
---	---	--

Estas acciones de supervisión, se efectuarán sin perjuicio de las facultades de fiscalización que tiene el Servicio.

Como se indicó anteriormente, el informe describirá las no conformidades u observaciones, las cuales deberán ser respondidos por el Laboratorio Autorizado, en un plazo no superior a 10 días hábiles o según lo indicado en el informe de supervisión. Posteriormente, al recibir esta respuesta, el Servicio realizará una revisión documental de éstas, pudiendo solicitar más antecedentes, si así lo requiere, por las vías institucionales de comunicación disponibles. Luego de ello, se efectuará una segunda revisión, si así se requiere. Si después de esta revisión, existieran no conformidades críticas que no puedan ser subsanadas, por parte del Laboratorio Autorizado, pasarán a considerarse un incumplimiento.

En caso que los supervisores SAG detecten que las no conformidades e incluso los incumplimientos, se deben al actuar del Responsable Técnico, el Servicio podrá sugerir al autorizado, en el informe de supervisión, que postule a un nuevo Responsable Técnico

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias detecta faltas en el desempeño del Laboratorio Autorizado, que afecten negativamente el resultado del Programa Oficial asociado a su autorización, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, el SAG podrá instruir al Laboratorio Autorizado mediante una carta suscrita por el/la jefe (a) del Departamento de Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización.

Lo anterior es sin perjuicio de la aplicación de una medida por incumplimiento o revocación de la resolución, según las causales establecidas en la resolución 3571 de 2021, Convenio de Autorización y el Reglamento Específico correspondiente.


En caso de revocación, el autorizado afecto a tal medida, quedará inhabilitado para postular nuevamente a esta autorización, por el plazo de dos (2) años contados desde la fecha en que quede ejecutada la resolución que establece esta medida.

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

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

8. Obligaciones

El tercero Autorizado deberá cumplir con lo establecido la resolución 3571 de 2020, que aprueba el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, Convenio de Autorización, Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos y las siguientes obligaciones específicas del presente Instructivo Técnico:

	SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile	Instructivo Técnico para la Detección de <i>Salmonella spp.</i> móviles según Metodología Tradicional OIE.	Código: D-ATR-AAT-24 V 02
---	---	---	------------------------------

- Seguir los protocolos establecidos en los numerales 5 y 6 del presente Instructivo Técnico.

9. Formulario

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

	SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile	Lista de responsables técnicos y analista(s) del laboratorio vinculado al análisis	Código: F-ATR-AAT-263 Versión: 01
--	---	---	---

Identificación del Laboratorio

Razón Social:

RUT:

Nombre completo	Cargo que desempeña. Responsable técnico y subrogante (RT) o analista (A)*	N° Cédula identidad	Firma	Técnicas autorizadas

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

Firma del Representante Legal

Fecha: ____/____/____

Anexo 9.2. Diagrama de flujo para clasificación de un pabellón/sector positivo a *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Tiphymurium y *Salmonella* Tiphymurium monofásica.

