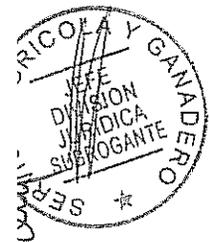


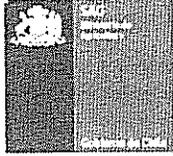
Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA SP. MÓVILES EN FECAS SEGÚN MÉTODO TRADICIONAL ISO 6579:2002/AMD 1 (E)

Tabla de Contenido

1	Objetivos y Alcance.....	2
2	Referencias y Documentos Relacionados.....	2
3	Definiciones y Abreviaturas.....	2
4	Requisitos.....	3
4.1	Requisitos infraestructura equipos materiales y reactivos.....	3
4.1.1	Equipos, instrumentos y materiales.....	3
4.1.2	Reactivos, soluciones y medios de cultivo.....	3
4.1.3	Estándares.....	4
4.2	Requisitos de personal.....	4
4.3	Requisitos específicos.....	5
4.4	Medios de Verificación de Requisitos.....	6
5	Análisis/Ensayo.....	6
5.1	Captación y envío de la muestra.....	6
5.2	Recepción y manejo de la muestra.....	7
5.3	Metodología.....	7
5.3.1	Preparación de la muestra.....	7
5.3.2	Selección de colonias para Pruebas Bioquímicas.....	9
5.3.3	Interpretación de las Pruebas Bioquímicas.....	9
5.3.4	Pruebas confirmatorias.....	12
5.4	Expresión de los resultados.....	13
6	Supervisión a los Laboratorios Acreditados.....	14
7	Obligaciones.....	15





Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

1 Objetivos y Alcance

El objetivo del instructivo es dar a conocer los requisitos específicos para la acreditación de laboratorios por parte del SAG, para la realización del análisis/ensayo para detección de ***Salmonella sp. móviles*** en fecas y muestras ambientales en el área de producción primaria de aves, según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1(E), a partir de muestras oficiales provenientes de planteles comerciales de aves adscritos al Programa de Planteles de Aves bajo Certificación Oficial y los planteles comerciales de aves que se incorporen al Programa de Control de *Salmonella spp.* en planteles comerciales de aves.

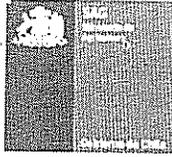
Del mismo modo, en este documento se estipulan instrucciones técnicas que deben cumplir los laboratorios para que obtengan y mantengan tal acreditación.

2 Referencias y Documentos Relacionados

- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025.Of 2005.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canada. Versión vigente.
- Programa de Control de Enfermedades Vigiladas en Aves. Servicio Agrícola y Ganadero de 2007.
- ISO / TS 11133-1:2000, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.
- ISO / TS 11133-2:2003, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.
- ISO 6579:2002/Amd 1(E) 2007. (Amendment 1 Annexe D). Detection of *Salmonella spp.* in animal faeces and environmental samples from the primary production stage.
- Instructivo Técnico para la Colecta y Envío de Muestras de Aves para Diagnóstico de Laboratorio. Servicio Agrícola y Ganadero.
- Resolución Exenta N° 1.397 de 2010, que aprueba Reglamento Específico para la acreditación de laboratorios de análisis/Ensayos.

3 Definiciones y Abreviaturas

MVL	Médico Veterinario Laboratorio
Protocolo Oficial	Documento emitido por el Médico Veterinario Oficial del SAG o Médico Veterinario Acreditado: "Protocolo de Toma de Muestras del Proyecto Nacional de Vigilancia Epidemiológica en Aves y Resultados Laboratorio".
SAG	Servicio Agrícola y Ganadero
Laboratorio Oficial	Laboratorio Perteneiente al Servicio Agrícola y Ganadero
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
MVO	Médico Veterinario Oficial del SAG
MVA	Médico Veterinario Acreditado
INN	Instituto Nacional de Normalización
ISO	International Organization for Standardization



4 Requisitos

4.1 Requisitos infraestructura equipos materiales y reactivos

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

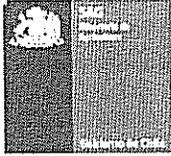
El Laboratorio debe poseer infraestructura adecuada a un nivel de Bioseguridad 2, de acuerdo a Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá. Versión vigente.

4.1.1 Equipos, instrumentos y materiales

- Agitador de tubos o vortex.
- Asa de nicrom o estériles de aro de 3 mm. de diámetro y asa en punta.
- Asas desechables estériles de 1 μ l.
- Autoclave.
- Balanza digital.
- Bolsas de plástico estériles resellables para Stomacher.
- Estufa de cultivo $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de cultivo $41.5^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Frascos Schott de 450 ml.
- Gabinete de Bioseguridad Clase II.
- Guantes desechables estériles.
- Lámpara o lupa con luz.
- Pipetas bacteriológicas desechables 10 y 1 ml.
- Placas Petri plásticas desechables.
- Gotarios estériles desechables.
- Placas de vidrio para aglutinación.
- Propipetas.
- Refrigerador.
- Stomacher.
- Toalla de papel absorbente.
- Pissetas.
- Baño termoregulado.

4.1.2 Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agua Peptonada Tamponada ISO (APT).
- Agar Modificado Semisólido Rappaport-Vassiliadis con Soya (MSRV) y Novobiocina (**10 mg/L**).
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) en placas de 90 o 100 mm.
- Agar Verde Brillante (BGA) u otro complementario al XLD.
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).
- Agar Tripticasa Soya. (TSA) o Agar Nutritivo (AN).
- Antisueros Somáticos (O) Polivalente A – I para *Salmonella sp.*(DIFCO)



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

- Antisueros Somáticos (O) Monovalentes para *Salmonella sp.* (Grupos A al I). (DIFCO)
- Antisuero Flagelar (H) Polivalente (A-Z) para *Salmonella sp.* (DIFCO)
- Galería API 20 E. Biomerieux.
- 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%.
- Caldo Trypticase soya
- Test de Látex Oxoid
- Agar Urea.
- Formalina al 0.6%
- Reactivo de Kovacs
- Caldo RM-VP
- Discos ONPG
- Naftol
- KOH
- Creatina

NOTA: La composición, preparación y condiciones de mantención de los medios de cultivo mencionados anteriormente deben ser concordantes a lo señalado en ISO 6579:2002 y 6579:2002/Amd 1 (E), versión vigente.

4.1.3 Estándares

Se utilizarán como estándares Cepas ATCC de una *Salmonella sp* H₂S negativa y otra H₂S positiva, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726 Of. 2002. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo. Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse como controles positivos y negativos las cepas ATCC recomendadas por el fabricante de cada medio.

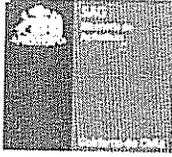
4.2 Requisitos de personal

a) Responsable Técnico:

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

- Título profesional calificado en el área biológica, de una carrera de al menos ocho semestres académicos, con experiencia laboral comprobable en el área de laboratorio de al menos 2 años y al menos con uno de ellos en el área de microbiología.
- Haber recibido capacitación en la realización del método *Salmonella sp.* móviles en fecas y túmulos de arrastre por Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la acreditación comprobada mediante certificado correspondiente.

b) Analista:



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

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

- Contar con título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de acreditación.
- Haber recibido capacitación en la realización del método *Salmonella sp.* móviles en fecas y tómulas de arrastre por Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E) en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la acreditación comprobada mediante certificado correspondiente.
- Tener competencia en la ejecución de la metodología a acreditar.

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

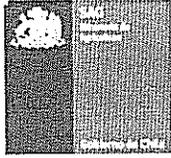
4.3 Requisitos específicos

El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de la NCh-ISO 17.025 Of. 2005, para lo cual debe estar acreditado ante el INN en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos.

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

El laboratorio debe contar con los siguientes documentos:

- Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la acreditación.
- Procedimiento e Instructivos Preparación de Medios de Cultivo involucrados en el alcance de la acreditación.
- Procedimiento /Instructivo Preparación y Esterilización de Material de Vidrio.
- Procedimiento /Instructivo Eliminación y Descontaminación de Residuos y Materiales.
- Procedimiento /Instructivo Aseo y Limpieza de Laboratorios.
- Procedimiento /Instructivo Control Biológico de Esterilidad en Autoclaves.
- Procedimiento /Instructivo de Verificación de Equipos.
- Procedimiento /Instructivo Control Material de Lavado.
- Procedimiento /Instructivo Control de Calidad Interno.
- Procedimiento /Instructivo Control de Ambiente.
- Procedimiento /Instructivo Manejo de Cepas Control.
- Lista Maestra de Equipos e Instrumentos de Medición involucrados en el alcance de la acreditación.



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

- Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.
- Programa de Mantenimiento /Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.

4.4 Medios de Verificación de Requisitos

El laboratorio solicitante deberá presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad, implementado en el laboratorio y que demuestren la acreditación en NCh-ISO 17025.Of. 2005 ante el INN, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos.

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

- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas (flujo de áreas limpias y sucias) y ubicación de equipos.
- Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención y calibración de estos.
- Lista de materiales y reactivos.
- Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance.
- Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista.
- Certificado de título de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Certificado que acredite los semestres académicos del personal que se desempeña como responsable técnico.
- Documentos que acrediten la capacitación tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a acreditar.
- Documentos especificados en el numeral 4.3 de este Instructivo.

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

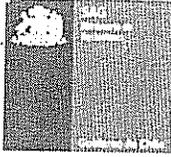
Con este fin, el SAG podrá someter al Responsable Técnico y a uno o más analistas identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica.

5 Análisis/Ensayo

5.1 Captación y envío de la muestra

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

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



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

La toma y tipo de muestra a recolectar debe realizarse de acuerdo a lo señalado en el Instructivo "Colecta y envío de muestras de aves para diagnósticos de laboratorio de *Salmonella* y *Mycoplasma*".

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

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

5.2 Recepción y manejo de la muestra

Para recepcionar las muestras el Laboratorio debe considerar los siguientes puntos:

- Integridad de las muestras.
- Tipo de Muestra de acuerdo a Programa Oficial
- Cantidad suficiente de muestras para el análisis.
- Identificación adecuada, de acuerdo al Protocolo Oficial SAG.
- Protocolo fuera del contenedor y con los datos requeridos.
- Deben venir refrigeradas y que no excedan las 24 horas desde su recolección hasta su recepción.
- Contenedor isotérmico con Sello.

5.3 Metodología

5.3.1 Preparación de la muestra

El día del procesamiento de las muestras, se coloca la balanza digital en el interior del gabinete de bioseguridad. Luego mediante el uso de instrumental estéril, se pesa cada muestra y se agrega la cantidad de Agua Peptonada Tamponada ISO (APT) necesaria en proporción de 1/10, por ejemplo a 25 ± 0.5 g de la muestra de fecas a analizar, se le agrega 225 ml. de APT; esto se realiza en una bolsa plástica resellable estéril para stomacher. La muestra no debe ser inferior a 10 gramos.

5.3.1.1 Pre enriquecimiento en medio líquido no selectivo:

Inocular la muestra en Agua Peptonada Tamponada (APT), previamente mantenida a temperatura ambiente. Incubar a 37 ± 1 °C durante 18 ± 2 h.

Inocular los controles positivos, posterior a la siembra de las muestras.

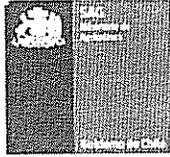
5.3.1.2 Enriquecimiento en medio selectivo semisólido:

Inocular las placas de Agar Modificado Semisólido Rappaport-Vassiliadis con Soya (MSRV) con el cultivo obtenido desde el punto 5.3.1.1.

Incuba las placas a $41,5 \pm 1$ °C. durante 24 ± 3 hr.

Asegurar que las placas de MSRV se encuentren a temperatura ambiente. Secar la superficie de éstas si se encuentran húmedas previo a la siembra.

Las placas no deben estar nunca en posición invertida.



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

Desde el caldo de APT, mediante una pipeta estéril desechable tomar un volumen total de 0,1 ml. (equivalente a tres gotas). Distribuir las gotas en la superficie de las placas de MSR/V, cuidando que se dispongan en forma separada y equidistante entre sí. Cuando se proceda a tomar el subcultivo desde el APT, es muy importante no levantar el material particulado de la muestra. Por lo tanto, los contenedores deben ser movidos cuidadosamente, sin mezclar ni batir.

Extraer el inóculo desde la interfase sin material particulado entre la muestra y la superficie del caldo de cultivo.

Incubar las placas de MSR/V a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 h. **NO INVERTIR LAS PLACAS.**

Observar las placas de MSR/V sobre una superficie clara o una luz blanca.

Las placas **positivas** mostrarán una zona de turbidez de color blanco grisáceo, extendida alrededor de la gota inoculada. La zona de turbidez se caracteriza por un halo blanco, con un borde claramente definido.

Si **no se observa desarrollo** en la placa a las 24 hr., incubar nuevamente durante 24 ± 3 hr.

5.3.1.3 Siembra en agar Selectivo

Con el cultivo obtenido desde el punto 5.3.1.2., inocular el contenido del asa (1 μl) en los dos siguientes medios selectivos sólidos (una asada en cada medio):

- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)
- Medio selectivo complementario al agar XLD, por ejemplo BGA.

Asegurar que las placas de agar XLD y del segundo medio selectivo se encuentren a temperatura ambiente. Secar la superficie de estas, si se encuentran húmedas.

Observar las placas de MSR/V y determinar cual es el punto más lejano de crecimiento desde la zona de inoculación e introducir un asa de 1 μl justo dentro del borde del halo opaco de crecimiento. Retirar el asa, asegurándose de no arrastrar medio MSR/V. Con el asa, inocular la superficie de la placa de XLD de manera de obtener colonias aisladas. Proceder de la misma manera para inocular la superficie del otro medio selectivo utilizando otra asa de cultivo estéril. Incubar las placas de XLD a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 3 horas.

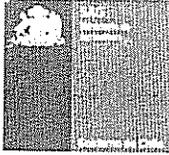
Incubar las placas del medio selectivo complementario, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las colonias típicas de *Salmonella* en agar XLD tienen un centro negro, rodeado de una zona ligeramente transparente de color rojizo, debido al cambio de color del indicador del medio. Las variantes de *Salmonella* H₂S negativas crecen en agar XLD de color rosa con un centro rosa oscuro.

Las cepas lactosa positivas de *Salmonella* crecen en agar XLD de color amarillo con o sin centro negro.

Revisar las colonias sospechosas de *Salmonella* en el segundo medio selectivo, de acuerdo a las especificaciones entregadas por el fabricante

NOTA: El reconocimiento de colonias de *Salmonella* se adquiere con la experiencia, ya que su apariencia puede variar no sólo según la serovariedad que sea, si no que además del batch de medio de cultivo selectivo utilizado.



5.3.2 Selección de colonias para Pruebas Bioquímicas

De cada placa de cada medio selectivo, seleccionar a lo menos **1 colonia típica** o sospechosa y posteriormente cuatro si la primera es negativa.

Si las colonias seleccionadas no se encuentran aisladas y puras, se deben estriar en la superficie de placas con XLD y segundo medio complementario (BGA) 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 hr.

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

Inocular cada una de las colonias obtenidas en Agar TSI, LIA, MIO, Agar Urea y en dos tubos de TSA. Además se puede realizar la prueba de ONPG y Caldo RMVP.

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 (siempre utilizando la misma colonia seleccionada), inocular el tubo de agar LIA, pinchando dos veces en profundidad y hacer estría en superficie. Luego inocular el agar MIO en picadura. Posteriormente, inocular el agar Urea y el caldo RMVP 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 SAG, para realizar la confirmación y el envío al ISP para la tipificación de la cepa, en caso de ser necesario.

Evitar tocar con el asa el agar, ya que los medios altamente selectivos suprimen el crecimiento de algunos organismos que pueden estar presentes.

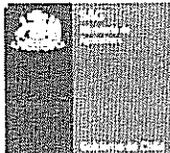
Incubar todos los medios utilizados para la batería bioquímica a $37 \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 24 ± 3 hrs.

Finalmente, si es necesario, realizar la prueba de ONPG y RMVP, utilizando un cultivo proveniente de la misma colonia seleccionada.

5.3.3 Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

5.3.3.1 Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)

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



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

5.3.3.2 Agar Hierro Lisina (LIA)

- Descarboxilación de la lisina
 - Descarboxila la lisina: Fondo y tendido púrpura (K/K).
 - No descarboxila la lisina: Fondo amarillo (A).
- Producción de gas
 - Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
 - No produce gas: sin cambios.
- Producción de 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).

5.3.3.3 Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO)

Movilidad

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

Producción de Indol

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

Descarboxilación de la Ornitina

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

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

5.3.3.4 Actividad Ureasa:

Estriar la superficie de Agar Urea con una colonia sospechosa e incubar a 37°±1 por 24±3 horas.

Si la reacción es positiva se libera amonio desde la Urea, con lo cual cambia el color del indicador (Rojo Fenol) desde un color rosa a un fucsia profundo.

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

5.3.3.5 Detección de β Galactosidasa

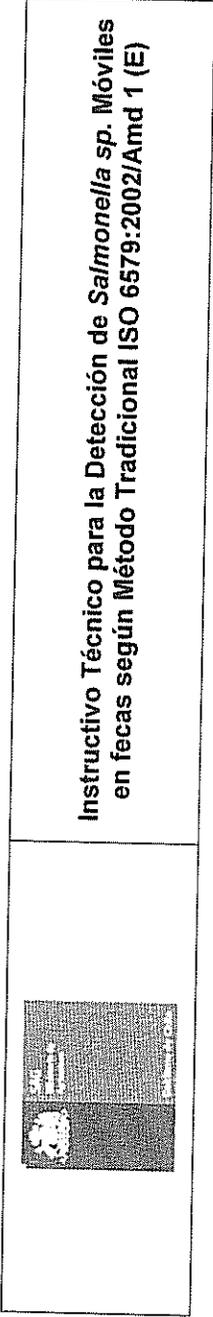
Utilizar los discos de ONPG siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.3.3.6 Reacción en medio Voges Proskauer

Suspender una colonia sospechosa en un tubo estéril que contenga 3 ml de medio RMVP. Incubar a 37±1° C por 24±3 horas.

Después de la incubación agregar 2 gotas de solución de creatina, 3 gotas de solución etanólica de 1- naftol y 2 gotas de hidróxido de potasio al 40%. Luego mezclar.

La formación de un color rosa a rojizo dentro de 15 minutos indica una reacción positiva.



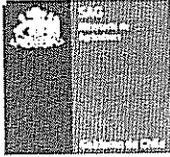
5.3.3.7 Cuadro Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

Agar TSI		Agar LIA			Agar MIO			Agar Urea	β-galacto sidasa (ONPG)	Medio Voges-Proskauer (VP)	Microorganismo
TSI	GAS	H2S	LIA	GAS	H2S	Mov.	Indol				
K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	-	-	Salmonella subespecie I Otras Salmonella
K/A	-	-	K/K	+	-	+	-	+	-	-	S. Choleraesuis Otras Salmonella
K/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	-	-	Salmonella Typhi
K/A	+	-	K/A	+	-	+	-	+	-	-	Salmonella sp S.Paratyphi A.
K/A	-	-	K/A	-	-	+	-	+	-	-	S.Paratyphi A.
K/A	-	+	K/A	-	+	-	-	+	-	-	S. Typhi (excepción)
A/A	+	+	K/K	+	+	+	-	+	+	-	Salmonella subg.III (Arizona)
K/A	+	+	K/K	+	+	+	-	+	+	-	Salmonella subesp.I Salmonella subg.III (Arizona)
K/A	+	+	K/A	+	+	+	-	+	+	-	Salmonella sp. Citrobacter freundii *

* Puede dar reacciones similares.

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

Código IT-LAB-26-v02



5.3.4 Pruebas confirmatorias

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

Someter a confirmación serológica todas las colonias que cumplan con las pruebas bioquímicas características para el género *Salmonella sp.*, de acuerdo a lo descrito en el numeral 5.3.3 y Cuadro 5.3.3.7.

Ocupar uno de los tubos de agar tripticasa soya (TSA) inoculados junto a la batería bioquímica.

Se debe tener la seguridad de ocupar **colonias puras y no utilizar colonias autoaglutinantes**. Para cumplir lo anterior prepare una suspensión bacteriana densa, adicionando al tubo de TSA con el cultivo sospechoso, suero fisiológico al 0.85% formulado. Colocar una gota de la suspensión bacteriana sobre una lámina de vidrio. 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 bacteria se ha agrupado en unidades más o menos diferenciables, el cultivo se considera autoaglutinante.

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

Si el cultivo no autoaglutina, confrontar en lámina de vidrio, una gota de suero polivalente somático A-I, con una gota de la suspensión bacteriana previamente realizada. Mezclar 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 las cepas aglutinan con el suero polivalente, corresponden al género *Salmonella sp.* Posteriormente, para identificar el serogrupo, repetir el procedimiento descrito anteriormente, realizando aglutinaciones con los sueros monovalentes somáticos, desde el grupo A hasta el grupo I.

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

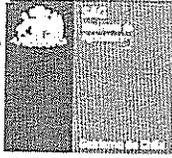
Inocular el cultivo proveniente del agar TSA en 5 ml de Caldo tripticasa soya (CTS). Incubar a $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 18 a 24 horas o hasta que el desarrollo bacteriano alcance una densidad de 3 en la escala de Mc Farland.

Adicionar al CTS inoculado, 5 ml. de solución salina que contenga 0.6% de formalina y dejar reposar 1 hr. En dos tubos distribuir 1 ml. de esta preparación (colocar 0,5 ml en cada tubo). Posteriormente agregar, a uno de los tubos, 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:
Utilizar 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 $48 - 50^{\circ} \text{C}$ en baño de agua, hasta 1 hr. Evitar agitarlos en exceso.



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

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, proceder a la lectura del tubo de prueba.

En el tubo de prueba observar 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 y comparar con controles.

5.3.4.3 Tabla de Interpretación de las Pruebas de confirmación

Reacciones Bioquímicas	Autoaglutinación	Reacciones Serológicas	Interpretación
Típicas	No	Antígenos O, Vi o H Positivo	Cepas deben ser consideradas como <i>Salmonella</i> .
Típicas	No	Todas las reacciones negativas (pruebas bioquímicas adicionales)	Pueden ser <i>Salmonella</i> .
Típicas	Si	No analizables (realizar pruebas bioquímicas adicionales)	
Atípicas	No/Si	Antígenos O, Vi o H Positivo	
Atípicas	No/Si	Todas las reacciones negativas	No son consideradas como <i>Salmonella</i> .

5.4 Expresión de los resultados

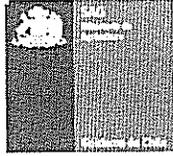
Con la ayuda de la Tabla expresada en el punto 5.3.4.3, realizar la expresión de resultados.

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

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

Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella*, pero no ocurre la aglutinación con el antisuero polivalente somático y flagelar, se deben realizar pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por el API 20 E. Si el resultado de estas pruebas es concordante con el género *Salmonella*, se informa como **Presencia de *Salmonella sp.***

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



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

Una vez que se haya seroagrupado la cepa, el responsable técnico del laboratorio acreditado debe enviarla al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, para realizar la confirmación del aislamiento, adjuntando la información de los resultados de las pruebas bioquímicas y serológicas e identificándola con el número de muestra consignado en el Protocolo oficial original, Registro y envío de Resultados.

Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del SAG, el cual debe ser firmado por el responsable técnico del laboratorio.

El responsable técnico del laboratorio, debe enviar los resultados en el Protocolo oficial del SAG al MVO; este último, una vez que verifique los datos remitidos en el protocolo, despachará cada una de las copias, de acuerdo a lo señalado en el "Manual de Programa de Enfermedades Vigiladas en Aves".

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

Cabe señalar, que además, el laboratorio acreditado debe mantener una copia de los resultados para sus registros, al menos durante tres años, los que deberían estar disponibles en las auditorías.

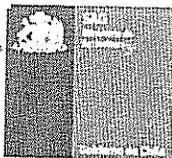
El laboratorio Oficial SAG, enviará los resultados de la tipificación entregada por el ISP, de las cepas de *Salmonella sp.* remitidas por el laboratorio acreditado, al nivel central, MVO del sector correspondiente al lugar de la obtención de la muestra y al laboratorio acreditado que envió el aislado.

6 Supervisión a los Laboratorios Acreditados

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

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

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



Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella sp.* Móviles en fecas según Método Tradicional ISO 6579:2002/Amd 1 (E)

7 Obligaciones

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

