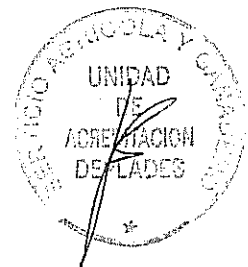


Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella* Mediante Método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09

Tabla de Contenidos

| Contenido | Página |
|---|---------------|
| 1 Objetivos y Alcance | 2 |
| 2 Referencias NORMATIVAS y Documentos Relacionados..... | 2 |
| 3 Definiciones y Abreviaturas | 2 |
| 4 Requisitos | 3 |
| 4.1 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos..... | 3 |
| 4.2 Requisitos de personal..... | 5 |
| 4.3 Requisitos específicos | 5 |
| 4.4 Medios de verificación de requisitos | 6 |
| Análisis/Ensayo..... | 7 |
| 5.1 Captación y envío de la muestra | 7 |
| 5.2 Recepción y manejo de la muestra..... | 7 |
| 5.3 Metodología | 7 |
| 5.3.1 Preparación de la muestra y pre - enriquecimiento NO selectivo..... | 7 |
| 5.3.2 Realización del test | 8 |
| 5.3.3 Confirmación | 10 |
| 5.4 Cálculo y expresión de los resultados | 15 |
| 6 Registro y envío de resultados | 16 |
| 7 Supervisión a los laboratorios acreditados..... | 16 |
| 8 Obligaciones | 16 |





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 **Salmonella Mediante Método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09**.

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

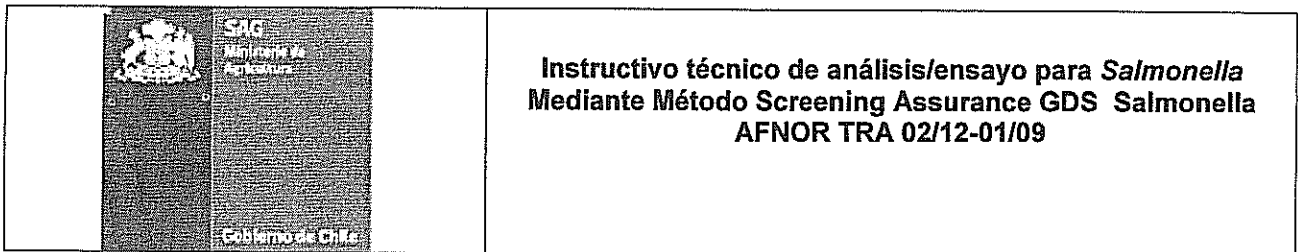
Este procedimiento aplica para muestras de piel de cuello de ave, enjuague de carcasa de aves y esponjas de superficie de carcasas, las cuales corresponden a muestreos microbiológicos oficiales tomados desde plantas de faenamiento de productos pecuarios de exportación.

2 REFERENCIAS 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.
- NCh 3162/1.Of2008, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Guía para la preparación y producción de medios de cultivo- Parte I: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.
- NCh 3162/2.Of2008, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Guía para la preparación y producción de medios de cultivo- Parte II: Guía práctica para los ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá Versión vigente.
- Assurance GSD Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09. Instructivo Técnico Biocontrol. Versión vigente.
- Reglamento específico para la Acreditación de Laboratorios Análisis/Ensayo. versión vigente.
- Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG. Versión vigente.
- Manual de uso Equipo Assurance GDS Rotor –Gene.
- Programa de Control Microbiológico de carnes faenadas para exportación. SAG. Versión vigente.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| Protocolo Oficial SAG: | Documentos emitidos por profesionales del SAG: "Protocolo de Toma de Muestra <i>E.coli</i> . Programa de Reducción de Patógenos". |
| USDA: | United States Department Agriculture. |
| FSIS: | Food Safety and Inspection Service. |
| SAG: | Servicio Agrícola y Ganadero. |
| ISO: | International Organization for Standardization. |



| | |
|--------------|--|
| AOAC: | Association of Official Analytical Chemists. |
| SAC: | Sistema de Aseguramiento de la Calidad. |
| MVO: | Médico Veterinario Oficial del SAG. |
| INN: | Instituto Nacional de Normalización. |
| AFNOR | Asociación Francesa de Normalización |

4 REQUISITOS


4.1 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos

i) Infraestructura:

- Infraestructura requerida para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- Equipamiento básico para realizar las actividades comprendidas en el alcance de la habilitación, de acuerdo a requisitos señalados en NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- El Laboratorio debe poseer infraestructura adecuada a un nivel Bioseguridad 2, de acuerdo a Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá (Versión Vigente).

ii) Equipos, instrumentos y materiales

- Balanza digital.
- 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 $48^{\circ}\text{-}50^{\circ}\text{C}$.
- Agitador de tubos o vortex.
- Autoclave.
- Stomacher 80 o 400
- Refrigerador.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Gotarios estériles.
- Pipetas estériles de 1 y 5 ml.
- Guantes desechables estériles.
- Asa de nicrom de aro y asa en punta.
- Placas de vidrio para aglutinación.
- Lámpara o lupa con luz.
- Placas Petri plásticas desechables.
- Tubos de ensayo.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Bolsas plásticas resellables, estériles.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras y pinzas.
- Assurance GDS Rotor –Gene.

| | |
|---|---|
|  | Instructivo técnico de análisis/ensayo para <i>Salmonella</i> Mediante Método Screening Assurance GDS™ <i>Salmonella</i> AFNOR TRA 02/12-01/09 |
|---|---|


- Dispensador de volumen a repetición.
- GDS Agitador Vortex.
- GDS bloque base concentración muestras.
- Micropipeta multicanal.
- Pickpen 8M.
- GDS celdas de concentración de muestras.
- GDS placas de resuspensión.
- GDS film adhesivo protector.
- Puntas estériles desechables para repetidora: 0.2 ml, 0.5 ml y 10 ml.
- Puntas desechables estériles para micropipeta de 0,2 y 1 ml.
- Bloque de aluminio.

iii) Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Agua Peptonada Tamponada. (ISO 6579:2002) Frasco Schott x 225 ml o en botella para dispensar 50 y/o 30 ml.
- Caldo soya tripticasa o triptosa.
- Kit Assurance GDS *Salmonella* Biocontrol fecha vigente.
- Enzima polimerasa recomendada por el kit GDS.
- Caldo cerebro corazón.
- Caldo RVS (ISO 6579:2002).
- Caldo Tetratoato Muller Kauffmann con novobiocina (ISO 6579:2002).
- Agar XLD y Agar SM2 chromID *Salmonella* o
- Agar Doble Modificado Lisina Hierro (DMLIA).
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO).
- Agar Tripticasa Soya (TSA).
- Antisuero Somático (O) Polivalente A – I para *Salmonella* sp.
- Antisueros Somáticos (O) Monovalentes para *Salmonella* sp. (Grupos A – I).
- Antisuero Flagelar (H) Polivalente para *Salmonella* sp.
- API 20 E de Biomerieux u otro equivalente.
- Agua Clase 4.
- Solución de suero fisiológico al 0.85%.
- Solución de suero fisiológico al 0.85% con formalina al 0.6%.
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1%.

iv) Estándares

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

| | |
|---|---|
|  | <p>Instructivo técnico de análisis/ensayo para <i>Salmonella</i> Mediante Método Screening Assurance GDS <i>Salmonella</i> AFNOR TRA 02/12-01/09</p> |
|---|---|

4.2 Requisitos de personal

i) Responsable técnico

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

- Título profesional calificado en el área biológica, de una carrera de al menos ocho semestres académicos, con experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología.
- Haber recibido capacitación en Método Screening Assurance GSD *Salmonella* AFNOR TRA 02/12-01/09, en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la acreditación, comprobable mediante certificado correspondiente.
- Calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a acreditar.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

ii) Analista(s):

El laboratorio deberá contar con analistas en número adecuado de acuerdo a la cantidad de análisis a realizar, quienes deben cumplir con los siguientes requisitos:

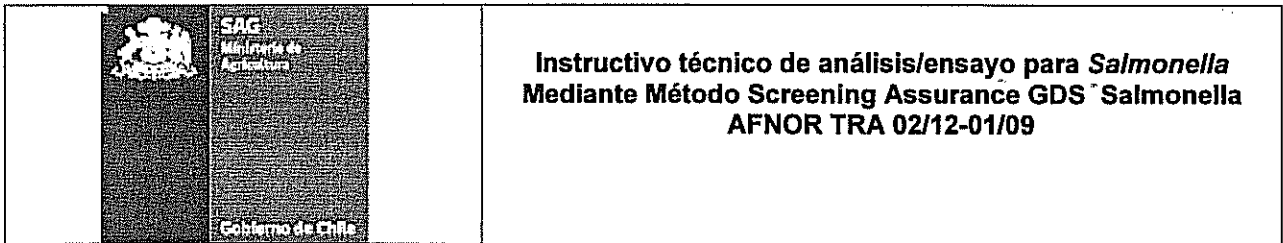
- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de acreditación.
- Haber recibido capacitación en el Método Screening Assurance **GDS** *Salmonella* AFNOR TRA 02/12-01/09, en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la acreditación, comprobable mediante certificado correspondiente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a acreditar.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

4.3 Requisitos específicos

El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de NCh-ISO 17025. Versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos. Una vez que el laboratorio solicitante obtenga la acreditación de las técnicas por el SAG, se le otorgará un plazo de 2 años para lograr la acreditación de éstas ante el INN.

Debe demostrar competencia en la ejecución de la metodología a acreditar y estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos.

El Laboratorio debe contar con los siguientes documentos:



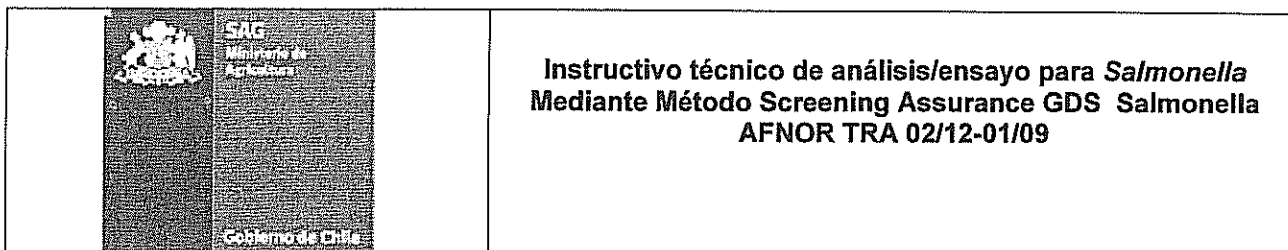
- Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la acreditación.
- Procedimiento e Instructivos Preparación de Medios de Cultivo involucrados en el alcance de la acreditación.
- Procedimiento /Instructivo Preparación y Esterilización de Material de Vidrio.
- Procedimiento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

4.4 Medios de verificación de requisitos

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

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

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



Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de Acreditación como en este Instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación, por los medios que considere idóneos para tal efecto. Con este fin, el SAG podrá someter al Responsable Técnico y a uno o más analistas identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica.

5 ANÁLISIS/ENSAYO

5.1 Captación y envío de la muestra

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

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

La toma y envío de muestras deben ser realizada por el Médico Veterinario Oficial del SAG (MVO), el cual debe adjuntar las muestras a un Protocolo Oficial SAG, en cuyo documento debe señalar al menos la identificación de cada una de ellas, el tipo de muestras, la fecha y la hora de la recolección de éstas.

Lo anterior debe realizarse de acuerdo a lo definido en el "Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG" última versión vigente.

5.2 Recepción y manejo de la muestra

La recepción y manejo de las muestras en el laboratorio deben realizarse de acuerdo a lo señalado en el "Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG". Versión vigente. Cabe señalar, la importancia de verificar los siguientes puntos:

- Temperatura de recepción (rango aceptado: 4 – 8 °C).
- Tiempo entre la toma de muestras y la recepción, ya que DEBEN SER PROCESADAS DENTRO DE LAS 24 HORAS DESDE LA TOMA DE LAS MUESTRAS.
- Integridad de las muestras.
- Cantidad suficiente de muestras para el análisis.
- Identificación adecuada.
- Contenedor con sello SAG intacto.
- Protocolo fuera del contenedor y con los datos requeridos de acuerdo al Manual anteriormente mencionado.

5.3 Metodología

5.3.1 Preparación de la muestra y pre - enriquecimiento NO selectivo

- **Método de esponja sobre carcasa (especies detalladas en el Manual del SAG señalado en las referencias).**
- La muestra de esponja debe ser recibida dentro de una bolsa plástica resellable estéril, previamente humedecida en 10 ml de Agua Peptonada Tamponada (APT).
- Luego, se deben adicionar 50 ml de APT, completando un volumen total de 60 ml. Homogeneizar la muestra apretando la esponja desde el exterior de la bolsa con las manos.
- Incubar el caldo de pre – enriquecimiento (APT) a 37 ± 1° C durante 18 – 24 horas.



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*
Mediante Método Screening Assurance GDS *Salmonella*
AFNOR TRA 02/12-01/09**

- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.
 - **Enjuague de carcasa (especies detalladas en el Manual del SAG señalado en las referencias):**
 - La muestra de lavado de carcasa debe ser recibida en un frasco que contenga 30 ml de agua de enjuague. Deben utilizarse frascos diferentes para cada análisis de *Salmonella* sp y *E.coli*.
 - Traspasar los 30 ml del enjuague a una bolsa de plástico estéril y adicionarle 30 ml de APT. Homogenizar en stomacher aproximadamente por 2 minutos o agitar fuertemente.
 - Incubar el caldo de pre – enriquecimiento (APT) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 18 – 24 horas.
 - Continuar como se indica en el punto 5.3.2.
 - **Piel cuello de ave:**
 - El día de procesamiento de las muestras, se coloca la balanza digital en el interior del gabinete de bioseguridad. Luego mediante el uso de utensilios estériles, se pesan 25 ± 0.5 g de la muestra a analizar, la cual se introduce al interior de una bolsa plástica estéril de stomacher.
 - Posteriormente se adiciona a la bolsa que contiene la muestra, 225 ml de Agua Peptonada Tamponada (APT). Todo el contenido de la bolsa se homogeniza en el stomacher por 2 minutos a velocidad media.
 - Incubar el caldo de pre – enriquecimiento (APT) a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 18 – 24 horas.
 - Continuar como se indica en el punto 5.3.2.
- * **NOTA:** Cabe señalar, que una vez realizado el paso anterior, se debe sembrar en forma paralela una cepa *Salmonella* sp H₂S negativa y otra H₂S positiva, cada una en tubos con 10 ml de APT, como control positivo del método.

Realización del Método Screening Assurance GDS *Salmonella* AFNOR TRA 02/12-01/09.

5.3.2 Realización del test

Consideraciones preliminares:

Asegúrese de contar con todos los reactivos vigentes y materiales necesarios para la realización de la prueba.

Delimite tres áreas de trabajo:

Un área para manipulación de reactivos del kit.

Un área para manipulación de muestras y cepas control, que será el gabinete de bioseguridad.

Un área donde colocar el Equipo GDS (rotor y su soporte computacional).

Para la manipulación de reactivos, debe usar guantes estériles al igual que tener la precaución de cambiarlos después de haber trabajado en el gabinete de bioseguridad, para evitar contaminación cruzada.

a) Preparación de la enzima polimerasa

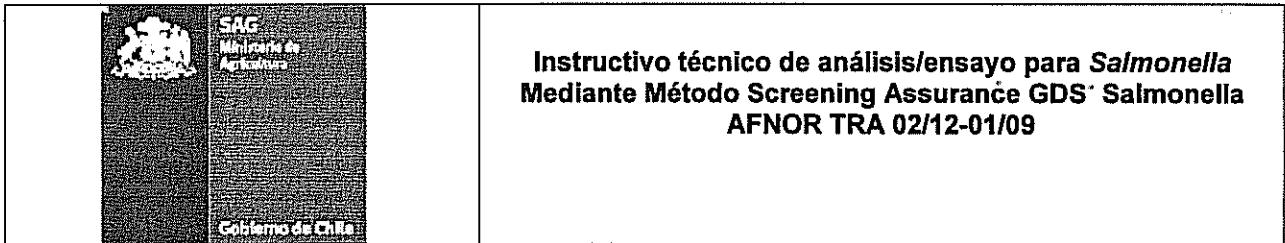
Remueva la enzima polimerasa de su envoltorio original y agregue 0.9 ml del Buffer de dilución de polimerasa que viene incluido en el kit GDS Assurance utilizando una micropipeta y una punta estéril. Mezcle aspirando 3 veces y transfiera todo el contenido del vial al tubo de dilución de polimerasa. Cierre e invierta 5 veces el tubo. Rotule con la



**Instructivo técnico de análisis/ensayo para *Salmonella*
Mediante Método Screening Assurance GDS *Salmonella*
AFNOR TRA 02/12-01/09**

fecha de preparación y como fecha de expiración coloque la fecha correspondiente a 6 a 8 semanas a partir de ésta La solución lista para el uso debe ser mantenida a 2-8 °C.

- b) Agite en vortex el **Reactivo de Concentración** .De esta manera las partículas quedan suspendidas en forma homogénea para ser dispensadas. Inmediatamente transfiera 20 uL a cada pocillo (Tiras de 8 unidades), de acuerdo al número de pruebas a realizar. Utilice una pipeta repetidora y puntas de 0,5 ml. Cubra los pocillos con una tira de película adhesiva para proteger el contenido.
- c) Transfiera 0,5 ml de Caldo Cerebro 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
- d) Cuidadosamente remueva la película adhesiva de los pocillos que contienen el **Reactivo de Concentración** y agregue 1 ml de la muestra incubada en APT (punto 5.3.1). La muestra tomada debe estar libre de material particulado. Debe ir cubriendo los pocillos de las series de 8 análisis en la medida que se van completando para evitar la contaminación entre muestras.
- e) Agite mediante vortex la placa a aproximadamente 900 rpm durante 10 a 20 minutos.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.
- f) Cuidadosamente retire y descarte las películas protectoras que cubren los pocillos de las muestras y de los pocillos con Caldo Cerebro Corazón.
- g) 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 30 segundos, 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 líquidos.
- h) Transfiera con la Pick-Pen la muestra a cada pocillo con Caldo Cerebro Corazón. 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 $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por un período de 2 a 4 horas.
- i) Dispense 35uL 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 a 4 horas a fin de asegurar que el contenido no se encuentre dispensado por un largo período de tiempo y se produzca desecación.
- j) Una vez terminada la incubación transfiera las partículas desde el Caldo Cerebro Corazón al Buffer de Resuspensión utilizando la PickPen. Cubra hasta el siguiente paso.
- k) Cambie los guantes para manipular los reactivos.
- l) Enfríe el bloque de aluminio a 2-8 °C durante al menos 20 minutos antes de su uso. Coloque los tubos de amplificación en el bloque. Selle bien el envase para preservar los viales no utilizados.



- m) Abra las tapas de los tubos de amplificación y dispense 10 uL de la polimerasa diluida con fecha vigente en cada uno utilizando una pipeta repetidora y una punta de 0,2ml. Este paso debe realizarse sólo 15 minutos antes de su uso.
- n) Transfiera 20 microlitros 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.
- o) 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.
- p) Numere cada vial de las series de 4 y coloque en el carrusel.
- q) Todo el proceso realizado con las muestras debe realizarse también en las cepas control H₂S positivas y H₂S negativas, por tanto cada conjunto de muestras procesadas simultáneamente deberá registrar en su reporte los resultados de las cepas control.
- r) Opere el equipo de acuerdo a las indicaciones del manual y las entregadas en el curso de capacitación.
- s) 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.

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 formato digital e impresos para ser archivados junto al protocolo de análisis como respaldo.

5.3.3 Confirmación

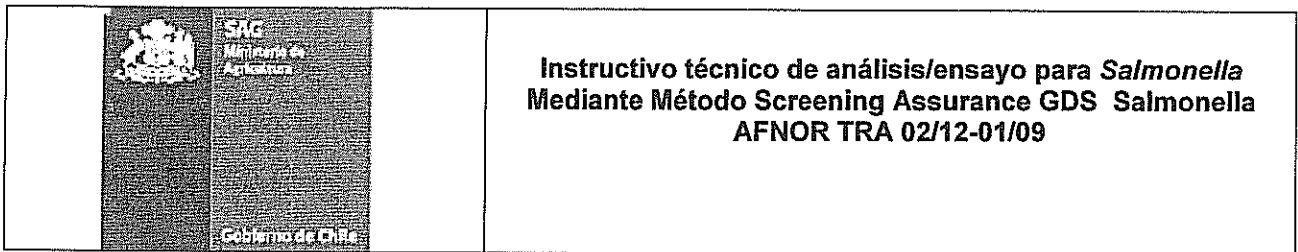
La confirmación deberá realizarse a partir del APT a la que se completará la incubación a 20 o 24 horas a $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Las muestras incubadas se pueden mantener a $2-8^\circ \text{C}$ por 48 horas antes de ser transferidas al caldo de enriquecimiento selectivo.

▪ Siembra el caldo de enriquecimiento selectivo

- Transfiera 0.1 ml de la muestra incubada en APT a 10 ml de RVS o Caldo Tetrionato Muller –Kauffmann con Novobiocina. Incube a $41,5 \pm 1^\circ \text{C}$ y a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por 18 a 24 horas, respectivamente.
- En caso de resultar negativa la confirmación con un caldo de enriquecimiento, proceda a la confirmación con el segundo caldo.

▪ Aislamiento en agar selectivo

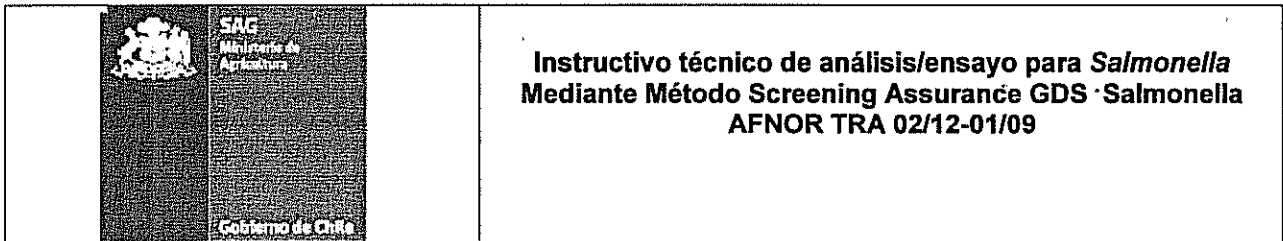
- Del caldo incubado siembre con asa desechable de 10 μ por agotamiento o siembra en estría sobre la superficie de Agar XLD y un segundo medio selectivo complementario.
- No subdividir las placas. Identificar las placas sembradas.



- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella* sp H₂S negativa y H₂S positiva), ambas en cada medio selectivo.
- 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 24 hrs. Seleccionar colonias de acuerdo a la presentación característica de las colonias de *Salmonella* sp en cada agar :
 - o Agar XLD: colonias negras o rojas con o sin centro negro. El borde o margen de la colonia podría permanecer amarillo dentro de las 24 horas, posteriormente debería virar a rojo.
 - o SM2 chrom ID *Salmonella* u otro medio cromogénico equivalente. SM2 colonias rosadas, opacas, de apariencia lisa y de bordes netos,
 - o Agar DMLIA: Seleccionar colonias púrpuras con o sin centro negro.
- Almacenar, bajo refrigeración todas las placas desde donde se seleccionaron colonias. Si el resultado de las colonias sospechosas es negativo, y si es apropiado, repicar nuevamente colonias desde las placas refrigeradas para una nueva confirmación.
- **Pruebas bioquímicas**
 - Seleccionar al menos una colonia típica o sospechosa, si las hay, de cada una de las placas de agar selectivo, para realizar las pruebas bioquímicas. Esto debe realizarse antes de que cualquier muestra sea informada como ausencia de *Salmonella* sp. Si esta colonia resulta negativa escoja hasta al menos 3 colonias por placa para considerar un resultado negativo.
 - Sólo es posible seleccionar colonias para realizar bioquímica si éstas se encuentran totalmente aisladas. En caso contrario se deberá realizar reaislamiento en el mismo tipo de agar selectivo original si al revisar las placas la siembra no proporcionó colonias aisladas.
 - Inocular cada una de las colonias en TSI, LIA, MIO y TSA.
 - 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 positivos del método.
 - Uno de los tubos de agar TSA se ocupa para realizar la confirmación serológica y el otro se debe mantener en refrigeración para ser enviado al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, para realizar la confirmación del aislamiento.
 - Incubar todos los medios utilizados para la batería bioquímica a 35 ± 1°C por 24 ± 2 hrs.

Interpretación de las Pruebas Bioquímicas


- **Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)**
 - Fermentación de la glucosa
Fermenta la glucosa: Fondo Amarillo (A).
No fermenta la glucosa: Fondo rojo (K).
 - Fermentación de la lactosa y/o sacarosa



Fermenta estos azúcares: Tendido Amarillo (A).
No fermenta: Tendido rojo (K).

- Producción de gas
Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
No produce: Sin cambios.
- Producción de H₂S
Produce H₂S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
No produce: Sin cambios.
- **Agar Hierro Lisina (LIA)**
 - Descarboxilación de la lisina
Descarboxila la lisina: Fondo y tendido púrpura (K/K).
No descarboxila la lisina: Fondo amarillo (A).
 - Producción de gas
Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
No produce gas: sin cambios.
 - Producción de H₂S
Produce H₂S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
No produce H₂S: Sin cambios.
 - Desaminación de la lisina
Desamina la lisina: Tendido rojo (R).
No desamina: Tendido púrpura (K).
- **Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO)**
 - Movilidad
Los microorganismos inmóviles sólo crecen en la línea de siembra y los móviles se reconocen por su desarrollo difuso alejado de la línea de inoculación.
 - Producción de Indol*
Produce Indol: Formación de un anillo rojo o rosado al agregar Reactivo de Kovacs.
No produce Indol: Anillo de color amarillo.
 - Descarboxilación de la Ornitina
Descarboxila la ornitina: Coloración azul, de intensidad variable.
No descarboxila la Ornitina: Coloración amarilla.

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

| | |
|--|--|
|  | Instructivo técnico de análisis/ensayo para <i>Salmonella</i> Mediante Método Screening Assurance GDS <i>Salmonella</i> AFNOR TRA 02/12-01/09 |
|--|--|

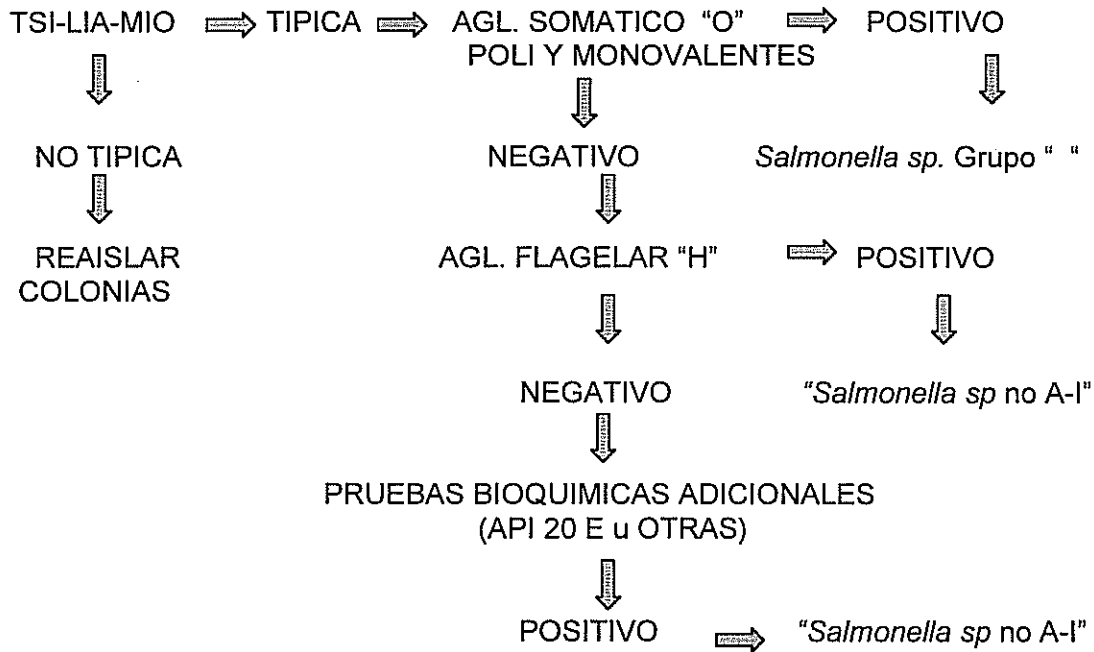
Cuadro 1: Interpretación de las Pruebas Bioquímicas

| Agar TSI | | | Agar LIA | | | Agar MIO | | | Microorganismo |
|----------|-----|------------------|----------|-----|------------------|----------|-------|----------|---|
| TSI | GAS | H ₂ S | LIA | GAS | H ₂ S | Mov | Indol | Ornitina | |
| K/A | + | + | K/K | - | + | + | - | + | <i>Salmonella</i> subespecie I Otras <i>Salmonella</i> |
| K/A | - | - | K/K | + | - | + | - | + | <i>S. Choleraesuis</i> Otras <i>Salmonella</i> |
| K/A | - | + | K/K | - | + | + | - | - | <i>Salmonella</i> Typhi |
| K/A | + | - | K/A | + | - | + | - | + | <i>Salmonella</i> sp <i>S. Paratyphi</i> A. |
| K/A | - | - | K/A | - | - | + | - | + | <i>S. Paratyphi</i> A. |
| 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</i> sp. <i>Citrobacter freundii</i> * |

* Puede dar reacciones similares.

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

Esquema 1: Pruebas bioquímicas y serológicas



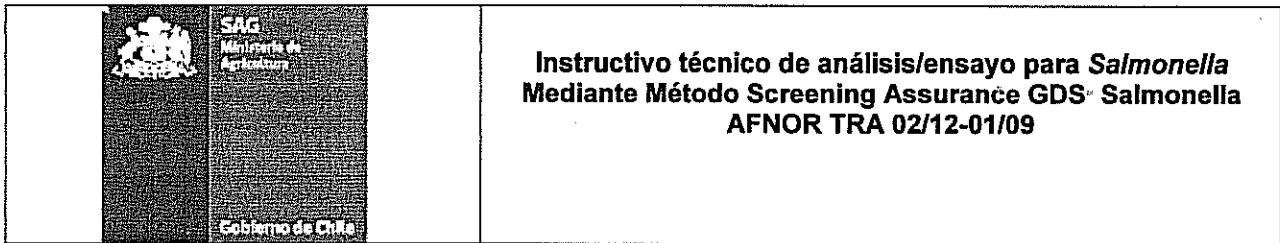
- **Confirmación basada en la identificación de antígenos somáticos (O) de *Salmonella*.**
 - Se someten a confirmación serológica al menos una colonia por placa que cumplan con las pruebas bioquímicas características para el género *Salmonella sp*, de acuerdo a lo descrito en Punto 5.3.3. Cuadro 1).
 - Se ocupa uno de los tubos de agar tripticasa soya (TSA) inoculados junto a la batería bioquímica. Se suspende el cultivo con aproximadamente 5 ml de solución salina al 0.85%.
 - Confrontar sobre la placa de vidrio para aglutinación, mediante el uso de gotarios estériles, una gota de suspensión del cultivo con una gota del suero somático polivalente A-I. Las gotas deben ser de volumen similar. 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 con luz incidente contra fondo oscuro.
 - **Si la cepa autoaglutina NO** puede ser seroagrupada y necesita pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por API 20 E.
 - Si la cepa no aglutina con el suero polivalente, puede deberse a la presencia de cápsula, por lo cual debe hervirse 15 minutos a una hora en baño de agua (tiempo que puede tardar en romper la cápsula). Después se debe confrontar nuevamente una gota del suero polivalente con una gota de suspensión del cultivo tratado por calor.



- Si las cepas aglutinan con el suero polivalente, corresponden al género *Salmonella* sp. Posteriormente, para identificar el **serogrupo**, se debe repetir el procedimiento descrito anteriormente, realizando aglutinaciones con los sueros monovalentes somáticos, desde el grupo A hasta el I.
- Si la cepa NO aglutina con ningún suero monovalente somático y posee pruebas bioquímicas características de *Salmonella* sp., debe continuarse con la serología flagelar.
 - **Confirmación basada en la identificación de antígeno flagelar (H) de *Salmonella*.**
- Inocular el cultivo proveniente del agar TSA en 5 ml de Caldo tripticasa soya (CTS). Incubar a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C durante 18 a 20 horas o hasta que el desarrollo bacteriano alcance una densidad aproximada de 3 en la escala de Mc Farland.
- Adicionar al CTS inoculado, 5 ml de solución salina que contenga 0.6% de formalina y dejar reposar 1 hora. En dos tubos distribuir 1 ml de esta preparación (colocar 0.5 en cada tubo).
- Luego, a uno de los tubos agregar 0.5 ml de antisuero polivalente H a dilución de trabajo, de acuerdo a instrucciones del fabricante. El otro tubo usarlo como control de autoaglutinación.
- NOTA: Ejemplo: Antisuero Flagelar H, polivalente A-Z Difco, se utiliza en una dilución 1:25. Añadiendo 0.1 ml de antisuero reconstituido a 2.5 ml de solución de NaCl al 0.85%. Realizar esta dilución al momento de su uso. Al mezclar cantidades iguales de antisuero diluido y aislado de prueba, la dilución final es de 1:100.
- Incubar ambos tubos a $48^{\circ} - 50^{\circ}$ C en baño de agua hasta 1 hora. Evitar agitarlos en exceso.
- Sacar los tubos del baño termorregulado evitando agitarlos en exceso antes de efectuar la lectura de la reacción.
- Efectuar la lectura del tubo utilizado como control de autoaglutinación para verificar la presencia de flóculos. Si esta reacción es positiva, la prueba de aglutinación no es válida, por lo tanto no se debe proceder a la lectura del tubo de prueba.
- En el tubo de prueba observe la presencia o ausencia de flóculos. Su presencia indica un resultado positivo. Su ausencia indica un resultado negativo.
- Opcionalmente, se puede usar el Test de Látex para *Salmonella* de Oxoid (seguir las instrucciones del fabricante).
- Registrar presencia o ausencia de aglutinación.

5.4 Cálculo y expresión de los resultados

- Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella* y si las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente y monovalente son positivas, se informa como Presencia de *Salmonella* sp. Grupo " "
- Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella* y las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente son negativas y positivas con el antisuero flagelar polivalente (H), se informa como Presencia de "*Salmonella* sp no A - I".
- Si después de seguir el esquema 1 descrito en el Punto 5.3.3., la aglutinación con el antisuero polivalente flagelar no ocurre, se deben realizar pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por el API 20 E de Biomerieux. Si el



resultado de estas pruebas es positivo, se informa como Presencia de "Salmonella sp no A – I".

- Si las reacciones bioquímicas no son típicas, si las pruebas de confirmación serológica somática y flagelar son negativas, se informa como Ausencia de *Salmonella* sp.
- Una vez que se haya serogrupo la cepa, el responsable del Laboratorio debe enviarlas, adjuntando la información de los resultados de las pruebas bioquímicas e identificándola con el número de muestra y número de Protocolo consignado en el Protocolo Oficial original, al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias para realizar la confirmación del aislamiento. Este envío debe ser efectuado en un lapso no mayor de 10 días, desde la fecha de obtención de la cepa.

6 REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS

Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del S.A.G., el cual debe contener la firma y nombre del responsable del laboratorio.

El responsable Técnico del laboratorio debe enviar los resultados en el Protocolo Oficial del S.A.G. de acuerdo a lo señalado en los Manuales correspondientes. Cabe señalar, que además debe mantener una copia de los resultados para sus registros en el laboratorio, los cuales deberán estar disponibles para supervisiones.

7 SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS ACREDITADOS

Todo laboratorio acreditado será supervisado mediante visitas de auditorías de seguimiento al menos una vez al año. El Servicio podrá realizar auditorías adicionales cuando lo estime conveniente. La respuesta a las No Conformidades y Observaciones encontradas durante la auditoría, deberán ser contestadas por el Laboratorio Acreditado, en un plazo no superior a 10 días hábiles desde la recepción del informe de auditoría emitido por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias. La renovación de la acreditación quedará supeditada a la emisión de un informe, que indique que el laboratorio acreditado no posee No Conformidades que afectan el desempeño, conforme a las especificaciones contenidas en los Instructivos Técnicos y Reglamento Específico de Acreditación.

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

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

8 OBLIGACIONES

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