



## RESOLUCIÓN EXENTA N°:7031/2016

### APRUEBA INSTRUCTIVOS TÉCNICOS PARA REALIZAR ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS DE EXPORTACIÓN.

Santiago, 28/ 11/ 2016

#### VISTOS:

Lo dispuesto en la Ley N° 18.755, Orgánica del Servicio Agrícola y Ganadero; la Ley N° 18.575, Orgánica Constitucional sobre Bases Generales de la Administración del Estado; el Decreto Supremo N° 117 de 2015, del Ministerio de Agricultura; la Resolución Exenta N° 1.600 de 2008, de la Contraloría General de la República; en la Resolución Exenta N° 529 de 2012, que norma el Sistema Nacional de Autorización de Terceros; la Resolución Exenta N° 90 de 2014, que aprueba el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos; y las facultades que invisto como Director Nacional de la Institución:

#### CONSIDERANDO:

1. Que el Servicio Agrícola y Ganadero se encuentra facultado para certificar la aptitud para el consumo humano de productos agropecuarios primarios destinados a la exportación.
2. Que la inocuidad se refiere a la condición de los alimentos que da garantía que los peligros presentes en ellos no causarán daño al consumidor, cuando se preparen o consuman de acuerdo con el uso a que se destinen.
3. Que de acuerdo a lo anterior, le corresponde al Servicio establecer los procedimientos que los productores, exportadores o demás actores de la cadena de exportación de productos agropecuarios, deben cumplir cuando existe un requerimiento oficial en materia de inocuidad alimentaria por parte de un determinado mercado.
4. Que el Servicio actualmente cuenta con programas y acciones que contribuyen a que los productos hortofrutícolas primarios que se exportan cumplan con exigencias de inocuidad alimentaria, entre las cuales, está el Programa de monitoreo oficial de residuos de plaguicidas en productos vegetales.
5. Que a raíz de nuevos requerimientos de mercados de destino, es necesario incorporar el monitoreo de contaminantes biológicos (*Salmonella* spp. y *E. coli*) en productos hortofrutícolas de exportación.
6. Que, en este contexto, es necesario fortalecer la red de laboratorios oficiales que puedan dar oportuno servicio de análisis para la detección de contaminantes biológicos, mediante su incorporación al Sistema Nacional de Autorización de Terceros.
7. Que la Resolución Exenta N° 529, de fecha 26 de enero de 2012, de la Dirección Nacional del SAG, establece que la autorización de terceros estará circunscrita sólo para aquellas actividades contempladas en Reglamentos Específicos de Autorización emanados de la Dirección Nacional del Servicio.
8. Que mediante Resolución Exenta N° 90 de 2014, se aprobó el “Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos”, el cual estipula que se debe contar con un Instructivo técnico para cada análisis/ensayo, incorporado en el Sistema Nacional de Autorización de Terceros.
9. Que por lo antes expuesto, es necesario definir los requisitos técnicos que deben cumplir los laboratorios autorizados para la correcta ejecución de las actividades de monitoreo que lleve a cabo el SAG para dar respuesta a requerimientos de las autoridades de los países de destino.

#### RESUELVO:

1. **Apruébase** el Instructivo técnico para el muestreo y diagnóstico de *Escherichia coli* en productos hortofrutícolas de exportación, código D-GF-CGP-PT-035, el cual forma parte integrante de la presente resolución y se transcribe en los siguientes términos:

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y DIAGNÓSTICO DE *ESCHERICHIA COLI* EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS DE EXPORTACIÓN**

**1 OBJETIVOS Y ALCANCE**

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

El alcance de la autorización corresponderá a la colecta de muestras en plantas de proceso y embalaje en el producto final.

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

- o Método Tradicional de Cultivo basado en Official Method AOAC 966.24.
- o Método Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14.
- o Método TEMPO EC AFNOR BIO 12/13-02/05.

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

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

Esta autorización se otorgará con carácter nacional.

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

**2 REFERENCIAS NORMATIVAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS**

- o Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- o Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002.
- o Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- o International Standard ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- o Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá Versión vigente.
- o Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos, versión vigente. Servicio Agrícola y Ganadero.
- o Método Oficial AOAC 991.14: Placa Petrifilm® Recuento de *E. coli* y coliformes en alimentos (método de film seco rehidratable).
- o Método Oficial AOAC 966.24: Coliform Group and *Escherichia coli* in Tree Nut Meats.
- o Detección de Bacterias Causantes de Cancrosis desde Frutas Asintomáticas a Campo y en Galpón de Empaque. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Boletín Informativo del Departamento Frutales. Argentina. Citrusmisiones N°31,19p. 2006.
- o Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación. Servicio Agrícola y Ganadero.
- o TEMPO EC AFNOR BIO 12/13-02/05. Validation study according to the EN ISO 16140 standard. Biomerieux.
- o Manual de uso TEMPO EC (*E. coli*) Ref. 80 004. Biomerieux 12597J-es-2013/03.
- o Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (NMP). En: Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2009. 2ªed. Facultad de Química, UNAM. México.

**3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS**

<b>USDA:</b>	United States Department Agriculture.
<b>FSIS:</b>	Food Safety and Inspection Service.
<b>SAG:</b>	Servicio Agrícola y Ganadero.
<b>ISO:</b>	International Organization for Standardization.
<b>AOAC:</b>	Association of Official Analytical Chemists.
<b>SAC:</b>	Sistema de Aseguramiento de la Calidad.
<b>INN:</b>	Instituto Nacional de Normalización.

<b>AFNOR:</b>	Asociación Francesa de Normalización
<b>Laboratorio Autorizado:</b>	Persona natural o jurídica reconocida y aprobada por el Servicio para ejecutar uno o más análisis/ensayos determinados, en el marco de programas oficiales del SAG, bajo condiciones definidas por el Reglamento específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos y los correspondientes instructivos técnicos.

#### 4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN

##### 4.1 REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA, EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

###### 4.1.1 Infraestructura

Infraestructura requerida para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025. Versión vigente.

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

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

Respecto del muestreo, debe contar con infraestructura destinada a:

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

###### 4.1.2 Equipamiento

El laboratorio debe contar con los equipos necesarios, acordes al volumen de muestras, que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar. Deben contar con su certificado de mantención y/o calibración al día, efectuado a lo menos una vez cada 2 años por una empresa pertinente y reconocida en el área, y un programa de mantención y calibración de éstos de acuerdo a las necesidades y requerimientos del Laboratorio.

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

- Balanza digital entre el rango de los 250g y 2.500g.
- Estufa de cultivo 35°±1°C.
- Agitador de tubos o vortex.
- Autoclave para medios, tampones y material limpio.
- Autoclave para descontaminación.
- Agitador orbital o Stomacher dependiendo del tamaño de la muestra.
- Agitador
- Refrigerador.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Congelador.
- Microscopio.

Adicional para método 966.24:

- Baño de agua termoregulado para coliformes 45,5°C±0,2°C.

Adicional para método Petrifilm®:

- Aplicador Petrifilm®.
- Contador de colonias o equivalente.

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

- Vehículo adecuado para las labores relacionadas al muestreo.
- Computador.
- Equipo e instalaciones de refrigeración de uso exclusivo.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de 6±2°C (de uso exclusivo para terreno).

###### 4.1.3 Instrumentos y materiales

- Gotarios estériles.
- Pipetas desechables estériles de 1 y 5 ml o micropipetas.
- Recipientes estériles para contener el APT.
- Puntas estériles desechables para micropipetas.
- Guantes desechables estériles.
- Tubos de ensayo estériles.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.

- Bolsas plásticas resellables, estériles.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras.

Adicional para método 966.24:

- Asa desechable de nicrom, o desechable, en aro y asa en punta.
- Placas Petri plásticas desechables.
- Campanas Durham.

Adicional para método Petrifilm®:

- Placas Petrifilm 3M para Recuento de *E. coli*.

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

#### 4.1.4 Reactivos, soluciones y medios de cultivo

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

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

- Agua Peptonada Tamponada. (ISO 6579:2002) Frasco Schott x 500ml o en botella para dispensar, y además dispensada en 9ml en tubos de ensayo para las diluciones.

Adicional para método 966.24:

- Agar Levine con eosina y azul de metileno (LEAM).
- Agar Citrato de Koser.
- Agar Nutritivo.
- Caldo EC.
- Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST). Tubos de ensayo con 10ml y campana Durham.
- Caldo MR – VP.
- Caldo Triptona.
- Reactivo de Kovacs.
- Solución de alfa-naftol 5%.
- Solución de KOH al 40%.
- Agua clase 4.
- Reactivos de Tinción de Gram.
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1%.

#### 4.1.5 Estándares

Se utilizarán como estándares cepas ATCC o de colecciones de referencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes*, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726.

Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo.

Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse las cepas ATCC recomendadas por el fabricante, tanto para controles positivos como controles negativos.

## 4.2 REQUISITOS DE PERSONAL DE LABORATORIO

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

### 4.2.1 Responsable técnico

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

- Título profesional del área biológica o afín, de preferencia Ingeniería Agronómica, Biología, Microbiología, Ingeniería en Alimentos, Bioquímica, Biotecnología. Con experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología, específicamente en análisis de alimentos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Haber recibido capacitación en uno o más de los métodos de análisis descritos en el alcance, de acuerdo a la metodología a solicitar autorización. Comprobable mediante el certificado correspondiente.
- Calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar. Deberá presentar un Informe que especifique los análisis realizados por el personal que se está postulando y los criterios escogidos para demostrar competencia.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

#### 4.2.2 Analistas

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

- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización, con experiencia laboral comprobable en el área análisis de laboratorio de al menos 6 meses, específicamente en análisis bacteriológico de alimentos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Haber recibido capacitación y demostrar competencia en uno o más de los métodos de análisis descritos en el alcance, comprobable mediante el certificado correspondiente.
- Calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar. Deberá presentar un Informe que especifique los análisis realizados por el personal que se está postulando y los criterios escogidos para demostrar competencia.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

#### 4.3 REQUISITOS DEL PERSONAL PARA MUESTREO

El postulante deberá contar con 1 o más equipos de muestreo, los cuales estarán conformados por a lo menos 2 personas que desempeñarán las siguientes funciones:

##### 4.3.1 Jefe de equipo

El Jefe de equipo deberá cumplir con el siguiente perfil:

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

##### 4.3.2 Personal de apoyo

El personal de apoyo deberá cumplir con lo siguiente:

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

#### 4.4 REQUISITOS ESPECÍFICOS

El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de Norma-ISO 17025, versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN u otra entidad acreditadora, en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos.

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

El Laboratorio debe contar con los siguientes documentos:

- Procedimiento o instructivo manejo de muestras involucrados en el alcance de la autorización.
- Procedimiento e instructivos preparación de medios de cultivo involucrados en el alcance de la autorización.
- Procedimiento o instructivo preparación y esterilización de material de vidrio.
- Procedimiento o instructivo eliminación y descontaminación de residuos y materiales.
- Procedimiento o instructivo aseo y limpieza de laboratorios.
- Procedimiento o instructivo control biológico de esterilidad en autoclaves.
- Procedimiento o instructivo de verificación de equipos.
- Procedimiento o instructivo control material de lavado.
- Procedimiento o instructivo control de calidad interno.
- Procedimiento o instructivo control de ambiente.
- Procedimiento o instructivo manejo de cepas control.
- Lista maestra de equipos e instrumentos de medición involucrados en el alcance de la autorización.
- Instructivos de uso de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Programa de mantenimiento /verificación / calibración de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Instructivo de manejo y protección de datos computacionales.

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

#### 4.5 MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS

El laboratorio solicitante deberá presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad, implementado en el laboratorio. Además, si el laboratorio cuenta con la acreditación en NCh-ISO 17025, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos, deberá presentar la documentación de respaldo.

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

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

- o Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas (flujo de áreas limpias y sucias) y ubicación de equipos.
- o Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención y calibración de éstos.
- o Lista de materiales, reactivos y Kits.
- o Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance.
- o Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista (titular y subrogante).
- o Certificado de título del Responsable Técnico y su subrogante, en original o fotocopia legalizada.
- o Certificado de título de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- o Documentos que acrediten la capacitación tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- o Documentos que acrediten la competencia técnica tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- o Instructivos especificados en el numeral 4.4 de este Instructivo.

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

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

## 5 DESCRIPCIÓN DEL MUESTREO Y ANALISIS

### 5.1 CAPTACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

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

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

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

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

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

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

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

Producto	Observaciones	Cantidad por muestra	Cantidad de muestras
Fruta fresca	Frutos extra grandes, piña, melón, entre otros.	1-2 U	5
	Frutos grandes, Naranjas, Granadas, Uva de mesa, entre otros.	5-10 U	5
	Frutos de tamaño medio, ciruelas, damascos, duraznos, entre otros.	10 U	5
	Fruta de tamaño pequeño, arándano, frutilla, frambuesa, entre otros.	500g	5
Fruta deshidratada	Pasas, entre otros.	500g	5

Hortalizas	En caso de unidades compactas, asimilar, la cantidad por muestra, a la fruta fresca, de acuerdo a su tamaño.	1-2 U 5-10 U 10 U 500g	5
	En caso de hortalizas de hoja, tales como puerro, perejil, espinaca, entre otros.	500g	5

## 5.2 INCORPORACIÓN COMO USUARIO AL SISTEMA INFORMÁTICO SAG

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

## 5.3 TRASLADO O ENVÍO DE MUESTRAS

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

## 5.4 RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA

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

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

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

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

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

## 5.5 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- En primera instancia las muestras se deben pesar en una balanza calibrada, sin abrir la bolsa, y agregar aseptícamente Agua Peptonada Tamponada (APT) estéril en una relación 1:1 (1g/ml).
- Todo el contenido de la bolsa se homogeniza en el agitador orbital o Stomacher, dependiendo del volumen de la muestra, por 15-20min.
- Traspasar 30ml de la muestra a un frasco estéril. Esta preparación corresponde a la dilución  $10^0$ .
- Se deben utilizar frascos diferentes para cada análisis de *Salmonella* spp. y *E. coli*.
- A partir de la muestra del frasco ( $10^0$ ) realizar diluciones seriadas en APT.
  - $10^{-1}$ : a un tubo de ensayo con 9ml de APT estéril, agregar 1ml de la muestra del frasco  $10^0$ .
  - $10^{-2}$ : a un tubo de ensayo con 9ml de APT estéril, agregar 1ml de la muestra del tubo  $10^{-1}$ .

Para este tipo de análisis no se utilizarán contramuestras.

## 5.6 METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO

### 5.6.1 Método Tradicional de Cultivo basado en Official Method AOAC 966.24

#### 5.6.1.1 Prueba presuntiva

- A partir de las tres diluciones proceder a la inoculación de los tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST) con campanas Durham invertidas. Inocular:
  - 3 tubos, cada uno con 1ml de la dilución  $10^0$
  - 3 tubos, cada uno con 1ml de la dilución  $10^{-1}$
  - 3 tubos, cada uno con 1 ml de la dilución  $10^{-2}$
- Comenzar la inoculación por la dilución más alta  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$  y por último  $10^0$  utilizando pipetas estériles.
- En total se inoculan 9 tubos de caldo LST por muestra.
- El tiempo entre la preparación de la muestra y su inoculación en un medio no debe ser superior a 15 minutos.
- Agitar suavemente la gradilla para mezclar la muestra con el medio de cultivo.
- Incubar los tubos inoculados a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  durante  $48\pm 2$ hrs.
- Los tubos se examinan a las  $24\pm 2$ hrs y son positivos aquellos que tengan presencia de gas, evidenciado por el desplazamiento de líquido en la campana de fermentación Durham (burbuja) o por la efervescencia cuando los tubos se agitan suavemente.
- Reincubar los tubos negativos por 24hrs más y reexaminar la presencia de gas. La presencia de gas significa una **prueba presuntiva** para coliformes. Se **registra como positivo, cualquiera sea la cantidad de gas producido**. Ausencia de gas a las 48hrs significa **prueba presuntiva negativa para coliformes**.

- Si se detecta que el equipo no ha funcionado dentro del rango de temperatura indicado, el análisis debe ser invalidado.
- Registrar el número de tubos positivos de cada dilución.

#### 5.6.1.2 Inoculación en Caldo EC

- Todos los tubos que resulten positivos a las 24 o 48 horas en el Test Presuntivo se transfieren a caldo EC para confirmar *E. coli*.
- Los tubos con caldo EC, previo a ser inoculados, deben ser temperados a 45,5±2°C.
- Mezclar por agitación el tubo presuntivo positivo de caldo LST y transferir un inóculo de cada tubo, utilizando un asa desechable en aro, a tubos de fermentación conteniendo caldo EC, con campana Durham invertida. Se debe tener la precaución de enfriar el asa para asegurar que se transfiere un inóculo de cultivo viable.
- Los tubos con caldo EC inoculados se incuban en un baño termoregulado para coliformes (con agitación y cubierta) a 45.5±0,2°C por intervalos de 24±2hrs y 48±2hrs. El nivel de agua del baño termoregulado debe sobrepasar el nivel del caldo dentro de los tubos (aproximadamente 1cm).
- Se debe observar la **formación de gas y turbidez** en los tubos de fermentación de caldo EC a las 24±2hrs. En caso contrario incubar nuevamente hasta completar las 48±2hrs.
- Se deben incluir cultivos control en el baño de agua, se usa como control positivo una cepa de *Escherichia coli* y como control negativo una cepa de *Enterobacter aerogenes*. Se debe inocular siempre el control negativo antes del positivo.
- Si los controles positivo y negativo no se comportasen como tal o si se detecta que el equipo no ha funcionado dentro del rango de temperatura indicado, se debe invalidar el análisis.
- La presencia de **gas (efervescencia) y turbidez** en los tubos de fermentación de caldo EC significa una **prueba positiva**. **Ausencia de gas** significa **prueba presuntiva negativa** para *E. coli*.

#### 5.6.1.3 Confirmación para *E. coli*

- De cada tubo de caldo EC que presente formación de gas, transferir una asada a una placa de agar LEAM para obtener colonias aisladas.
- Incubar las placas invertidas 18 a 24 horas a 35±1°C.
- Al término del período de incubación observar las colonias sospechosas, con centro oscuro con o sin brillo metálico. Las colonias descoloridas se descartan del grupo de Coliformes por no ser frecuentemente lactosa fermentadora.
- De cada placa de agar transferir 2 o más colonias aisladas a un tubo de agar nutritivo o agar standard, incubar por 18 a 24 horas a 35±1°C para realizar pruebas morfológicas mediante Tinción de Gram y bioquímicas utilizando las reacciones IMViC (Indol, Rojo Metilo, Voges Proskauer y Citrato, ver Cuadro N°2). Repetir la inoculación en caldo LST para confirmar la producción de gas. Alternativamente se puede realizar un API 20 E o VITEK.

Cuadro N°2 Descripción de las pruebas bioquímicas IMViC

Prueba	Descripción	Resultado
Producción de Indol (I)	Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a 35°C/24±2hrs. Adicionar entre 0,2-0,3ml de reactivo de Kovacs.	La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera prueba positiva.
Producción de ácidos mixtos (Rojo de metilo, RM)	Inocular un tubo adicional con caldo RM-VP e incubarlo a 35°C/48±2hrs. Adicionar 5 gotas de solución de rojo de metilo.	Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo es una prueba negativa.
Producción de metabolitos neutros (Voges-Proskauer, VP)	Inocular un tubo con caldo RM-VP e incubarlo a 35°C/48±2hrs. Adicionar 0,6ml de solución VP1 y 0,2ml de solución VP2 y agitar. Dejar reposar durante 10min sin agitar el tubo.	Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rosa en la superficie.
Utilización del citrato (C)	Inocular un tubo con caldo citrato de Koser o Simmons un inóculo ligero para evitar turbiedad en el tubo. Incubar a 35°C/96hrs.	El desarrollo de del cultivo que se observa con la turbiedad del medio, se considera una prueba positiva.

- Todos los cultivos que fermenten la lactosa con producción de gas dentro de 48 hrs a 35±1°C, se observen como bacilos Gram negativos no esporulados y cuyo test IMViC sean + + - - (biotipo 1) o - + - - (biotipo 2), son considerados *E. coli*. (ver Cuadro N°3)

Cuadro N°3 Clasificación de tipos bioquímicos mediante pruebas IMViC.

I	MR	VP	C	Tipo
+	+	-	-	Biotipo 1 <i>E. coli</i>
-	+	-	-	Biotipo 2 <i>E. coli</i>



+	+	-	+	Típico intermedio
-	+	-	+	Atípico intermedio
-	-	+	+	Típico <i>Enterobacter aerogenes</i>
+	-	+	+	Atípico <i>Enterobacter aerogenes</i>

#### 5.6.1.4 Cálculo y expresión de resultados

- Calcular el NMP de *E. coli*, basándose en el número de tubos de caldo EC, en que se confirmó su presencia.
- Por lo tanto, mediante la confirmación de tubos positivos (gas y turbidez), se obtiene una serie de tres dígitos, la cual se interpreta de acuerdo a lo señalado en las tablas AOAC 966.24A. A la lectura de esta tabla se le debe aplicar un factor de 0.1 (dividir por 10) dado que los tubos positivos comienzan desde la dilución  $10^{-1}$  y no  $10^0$ .
- Se debe informar como NMP/g.
- En caso de no obtener desarrollo en las placas se debe informar de acuerdo al límite de detección de la técnica: <3NMP/g.

#### 5.6.2 Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14.

La placa de 3M Petrifilm® Recuento de *E.coli* y Coliformes (EC), constituyen un sistema listo para usar que contiene elementos nutritivos de Violeta Rojo Bilis (V.R.B.), un agente gelificante soluble en agua, un indicador de la actividad glucuronidasa (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido) (BCIG) y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias.

##### 5.6.2.1 Desarrollo del test

- Colocar la placa Petrifilm® para Recuento de *E.coli*, en una superficie plana.
- Levantar el film superior y colocar 1 ml de la muestra ( $10^0$ ) o su dilución ( $10^{-1}$  o  $10^{-2}$ ) en el centro del film inferior.
- Bajar con cuidado el film superior sobre la muestra evitando que se formen burbujas de aire.
- Colocar el aplicador con la cara lisa hacia abajo en el centro de la placa.
- Presionar ligeramente el centro del aplicador para distribuir la muestra uniformemente.
- Distribuir el inóculo por toda el área de crecimiento del Petrifilm® antes de que se forme el gel. No deslizar el aplicador por el film.
- Sacar el aplicador y dejar la placa en reposo durante al menos un minuto para que el gel se solidifique.
- Por cada dilución existente siembre en una o dos placas.
- Incubar las placas en posición horizontal, cara arriba, en pilas de hasta 20 placas.
- Incubar las placas Petrifilm® EC para lectura de *E. coli* durante 48 h ± 4 h a 35°C ± 1°C

##### 5.6.2.2 Resultados e interpretación

- El recuento de las placas Petrifilm® EC puede hacerse en un contador estándar de colonias o equivalente. No contar las colonias desarrolladas sobre la zona blanca ya que no están bajo la influencia selectiva del medio. No contar las burbujas presentes debidas a artefactos.
- Para obtener el recuento de *E.coli* confirmados, se deben enumerar las colonias azules a rojo-azuladas asociadas a gas atrapado, independientemente del tamaño o intensidad de color. **Las colonias azules sin gas no se cuentan como *E. coli*.**
- Las colonias rojas y asociadas a burbujas de gas corresponden a Coliformes, por lo tanto no deberán ser consideradas dentro del recuento final de *E.coli*.
- El área de crecimiento circular del Petrifilm® es aproximadamente de 20 cm<sup>2</sup>. Pueden realizarse estimaciones en placas que contengan más de 150 colonias contando el número de colonias en uno o más cuadrados representativos y obteniendo el promedio. Multiplicar dicho número por 20 para obtener el recuento total por placa.
- Las placas Petrifilm® EC con una cantidad de colonias Muy Numerosa para Contar (MNPC) tienen una o más de las siguientes características: muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y un oscurecimiento del color del gel, ya que las altas concentraciones de *E.coli* causarán que el área de crecimiento se vuelva azul mientras que altas concentraciones de coliformes (no *E.coli*) causarán que el área de crecimiento se tome de un rojo oscuro.
- Si se requiere, las colonias pueden aislarse para una posterior identificación. Levantar el film superior y seleccionar la colonia del gel. Proceder al análisis siguiendo los métodos estándar.
- Si no es posible realizar el recuento después de terminada la incubación, las placas pueden conservarse en congelación a temperaturas bajo o igual a los - 15°C por un máximo de una semana, para efectuar el conteo. Esto es sólo para casos de emergencia, no se debe establecer como procedimiento rutinario.

El cálculo del recuento y la expresión de los resultados se realiza de la siguiente forma:

- Seleccionar las placas que presenten un rango de conteo entre **15 – 150 colonias**,
- En caso de realizar diluciones en duplicado se deben promediar el N° colonias encontradas en ambas placas de la misma dilución y multiplicar por el inverso de la dilución. En caso de realizar sólo una placa en diluciones consecutivas, registrar el número de colonias de cada dilución, multiplicar por el inverso de la dilución y luego determinar el promedio del recuento bacteriano entre ambas diluciones.
- Para el Recuento de *E. coli* los valores se informarán de acuerdo al número entero obtenido **sin cambios y sin aproximaciones** (ejemplo: 333, 90, 16 etc.).
- En el caso de valores obtenidos sobre o bajo el rango deben ser informados como Recuento Estimado en Placa (RESP).
- En caso de recuentos incontables se informará como Muy Numeroso Para Contar (MNPC).

- En caso de no obtener desarrollo en las placas se debe informar de acuerdo al límite de detección de la técnica:

< 1 UFC/g a Muestras en dilución directa ( $10^0$ ).

### 5.6.3 Método TEMPO EC AFNOR BIO 12/13-02/05

- El análisis TEMPO EC está diseñado para utilizarse exclusivamente con el sistema TEMPO para el recuento en 22-27 horas de *Escherichia coli* en productos alimenticios y muestras medioambientales.
- El test TEMPO EC consta de un frasco de medio de cultivo y una tarjeta, que son específicos para este test. El medio de cultivo se inocula con la muestra que se va a analizar. El medio inoculado se transfiere mediante el TEMPO Filler (Llenador TEMPO) a la tarjeta, que contiene 48 pocillos de tres volúmenes diferentes.
- Basada en la actividad  $\beta$ -glucuronidasa, la *Escherichia coli* presente en la tarjeta degrada el sustrato del medio de cultivo durante la incubación y emite una señal que es detectada por el TEMPO Reader (Lector TEMPO). En función del número y tipo de los pocillos positivos, el sistema TEMPO calcula el número de *Escherichia coli* presente en la muestra original según un cálculo basado en el método NMP.

#### 5.6.3.1 Procedimiento

- Retire el número necesario de frascos de medio de cultivo (un frasco por cada muestra que se analice) y espere a que alcancen la temperatura ambiente.
- Regule a 3ml el dosificador que contenga el diluyente secundario y cebe la bomba eliminando los dos primeros volúmenes dosificados.
- Inicie una sesión en la estación de preparación TEMPO.
- Siga las instrucciones de la interfaz de usuario de la estación de preparación: identifique la muestra que va a analizarse, bien introduciendo el identificador con ayuda del teclado o bien usando el lector de códigos de barras de la estación de preparación.
- Reconstituya el medio de cultivo dosificando 3ml de diluyente secundario por frasco con ayuda del dosificador.
- Con una pipeta estéril, aspire 1ml de la dilución  $10^{-1}$ , ver punto 5.5, y transfíralo al frasco que contiene el medio de cultivo reconstituido. Homogeneice durante unos 3 segundos utilizando un agitador tipo vórtex. Los 4ml de medio inoculado obtenidos corresponden a una dilución 1/40 de la muestra.
- Retire una tarjeta por cada frasco de medio inoculado, sin tocar la punta del tubo de transferencia. Compruebe que los códigos (colores y abreviaturas) de la tarjeta y del frasco de medio inoculado coinciden.
- Asocie el identificador de la muestra que va a analizarse con los códigos de barras del medio inoculado y la tarjeta correspondiente, con ayuda del lector de códigos de barras de la estación de preparación y siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario de la estación de preparación.
- Ponga el frasco que contiene el medio inoculado en la gradilla de llenado. Inserte la tarjeta en la ranura frente al frasco, introduciendo el tubo de transferencia de la tarjeta dentro del frasco. La gradilla puede alojar 6 frascos con sus tarjetas y permite el llenado simultáneo de 1-6 tarjetas TEMPO.
- Inserte la gradilla en el TEMPO Filler y comience el ciclo de llenado. El medio inoculado se aspira por completo en la tarjeta. Después de completarse el llenado de las tarjetas, el TEMPO Filler corta y sella los tubos de transferencia. Todas estas operaciones se realizan automáticamente y tardan unos 3 minutos. El ciclo de llenado es el mismo para todos los parámetros y permite llenar al mismo tiempo tarjetas para parámetros diferentes.
- Retire la gradilla de llenado del TEMPO Filler y compruebe visualmente que los frascos estén vacíos. Retire las tarjetas de la gradilla y transfíralas a las gradillas de incubación: inserte las tarjetas en las ranuras, con sus etiquetas orientadas hacia el usuario (hacia el asa de la gradilla). Las tarjetas que tengan que incubarse a la misma temperatura deben agruparse en la misma gradilla. Cada gradilla puede alojar 20 tarjetas. No inserte tarjetas entre las ranuras.
- Deseche los frascos y tubos de transferencia usados en un contenedor apropiado.
- Incube las tarjetas durante 24-27 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , para obtener unos niveles de rendimiento comparables con los de la norma EN ISO 16649-2 (1).

**Nota :** Como el tiempo mínimo de incubación de las tarjetas autorizado por el software del TEMPO es de 22 horas, el usuario debe prestar particular atención cuando realice los análisis en el ámbito del protocolo certificado NF VALIDATION, para garantizar que se respete el periodo mínimo de 24h de incubación.

**Nota:** El tiempo de incubación para el test está gestionado por el programa TEMPO Read que integra un intervalo teórico de 15 minutos entre la lectura del código de barras de la tarjeta y el comienzo de la incubación. Si el intervalo real resultase superior a 15 minutos (sin exceder 2 horas), este tiempo extra debe añadirse al tiempo de incubación restante visualizado por el programa TEMPO Read. Sin embargo, la lectura siempre deberá llevarse a cabo dentro del tiempo límite autorizado por el programa de 22-27 horas.

#### 5.6.3.2 Lectura de las tarjetas al final de la incubación

- Inicie una sesión en la estación de lectura.
- Inserte en el lector la gradilla de incubación que contiene las tarjetas que hay que leer. El lector explora el código de barras de cada tarjeta e interpreta los resultados de fluorescencia de los pocillos. Se asocia automáticamente el identificador de la muestra con el tipo de análisis, la dilución y los resultados del recuento. Se puede aplazar la lectura de las tarjetas TEMPO EC almacenándolas a  $2-8^\circ\text{C}$  tras su incubación durante un máximo de 48 horas (fuera del ámbito de la certificación AFNOR Validation). En este caso, deje que las tarjetas alcancen temperatura ambiente (aproximadamente 5-15 minutos) antes de introducirlas en el lector. Cabe destacar que el resultado obtenido incluirá la anotación "la tarjeta se ha leído demasiado tarde". El usuario puede anotar en el apartado de comentarios que las tarjetas se leyeron después de la refrigeración.
- Edición de los resultados: en la pantalla de la estación de lectura, se asocia el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo o mililitro de producto inicial con el identificador de la muestra, con el parámetro analizado y la fecha del análisis.
- La interfaz de usuario de la estación de lectura permite que los resultados se impriman o se transmitan al sistema de gestión de información del laboratorio (LIMS). El sistema también permite consultar los registros de los resultados obtenidos en los días anteriores.
- Al final del análisis, retire las tarjetas de la gradilla y deséchelas en un receptáculo apropiado.

### 5.6.3.3 Resultados e interpretación

El número de pocillos positivos obtenidos, en relación con el volumen de los pocillos y la dilución de la muestra, nos proporciona el resultado del recuento en UFC por gramo para la muestra original, mediante las tablas NMP (Número Más Probable).

#### 1.7 Expresión de resultados

- Si las muestras están bajo el nivel de detección de la técnica, se considera negativo, y en las observaciones se indica el límite de detección.
- Si las muestras están sobre el nivel de detección de la técnica, se considera positivo, y en las observaciones se indica la lectura.

#### 1.8 Variación de la metodología

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

## 6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS

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

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

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

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

Los resultados positivos solo son referenciales, corresponde a la Oficina SAG, encargada de emitir el Fitosanitario, rechazar o no una partida o lote, dependiendo de los límites máximos solicitados por el país de destino del producto hortofrutícola.

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

## 7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

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

La respuesta a las No Conformidades y Observaciones encontradas durante la Auditoría, deberán ser contestadas por el Laboratorio Autorizado, 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 autorización quedará supeditada a la emisión de un informe, que indique que el Laboratorio Autorizado no posee No Conformidades que afectan el desempeño, conforme a las especificaciones contenidas en los Instructivos Técnicos y Reglamento Específico de Autorización.

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

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

## 8 OBLIGACIONES

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

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

## 9 FORMULARIOS

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

## 2. Apruébase el Instructivo técnico para el muestreo y diagnóstico de *Salmonella spp.* en productos hortofrutícolas de exportación, código D-GF-CGP-PT-036, el cual forma parte integrante de la presente

resolución y se transcribe en los siguientes términos:

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

### **1 OBJETIVOS Y ALCANCE**

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

El alcance de la autorización corresponderá a la colecta de muestras en plantas de proceso y embalaje en el producto final.

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

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

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

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

Esta autorización se otorgará con carácter nacional.

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

### **2 REFERENCIAS NORMATIVAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS**

- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos, versión vigente. Servicio Agrícola y Ganadero.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá Versión vigente.
- Manual de uso Equipo VIDAS® o MiniVidas.
- VIDAS Salmonella SLM REF 30702. Instructivo Técnico Biomerieux.
- Assurance GSD Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09. Instructivo Técnico Biocontrol.
- Manual de uso Equipo Assurance GDS Rotor-Gene.
- International Standard ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- International Standard ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*
- Instructivo Técnico de Análisis/Ensayo para *Salmonella* Mediante Método Screening Assurance GDS Salmonella AFNOR TRA 02/12-01/09. Servicio Agrícola y Ganadero.
- Instructivo Técnico de Análisis/Ensayo para *Salmonella* mediante Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05.
- Detección de Bacterias Causantes de Cancrosis desde Frutas Asintomáticas a Campo y en Galpón de Empaque. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Boletín Informativo del Departamento Frutales. Argentina. Citrusmisiones N°31,19p. 2006.
- Colonización de *Salmonella spp.* sobre Manzanas "Golden Delicious", "Rayada" y "Red Delicious" de La Sierra de Querétaro y su Sobrevivencia a Agentes Germicidas. Tesis Magister. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos. México, 2012. 98p.
- Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación. Servicio Agrícola y Ganadero.

### **3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS**

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

### **4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN**

#### **4.1 REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA, EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS**

##### **4.1.1 Infraestructura**

Infraestructura requerida para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025. Versión vigente.

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

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

Respecto del muestreo, debe contar con infraestructura destinada a:

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

#### 4.1.2 Equipamiento

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

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

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

- Balanza digital entre el rango de los 250g y 2.500g.
- Estufa de cultivo 37°±1°C.
- Baño de agua temoregulado 48-50°C y 95-100°C.
- Agitador de tubos o vortex.
- Autoclave para medios, tampones y material limpio.
- Autoclave para descontaminación.
- Agitador orbital o Stomacher dependiendo del tamaño de la muestra.
- Refrigerador.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Congelador.

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

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

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

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

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

- Vehículo adecuado para las labores relacionadas al muestreo.
- Computador.
- Equipo e instalaciones de refrigeración de uso exclusivo.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de 6±2°C (de uso exclusivo para terreno)

#### 4.1.3 Instrumentos y materiales

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

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

- Dispensador de volumen a repetición.
- Micropipeta p10, p200, p1.000.
- Micropipeta multicanal p20.
- Pipeta repetidora y puntas adecuadas a los volúmenes usados.
- Pickpen 8M.

- GDS celdas de concentración de muestras.
- GDS placas de resuspensión.
- GDS film adhesivo protector.
- GDS bloque base concentración muestras.
- Puntas estériles desechables.
- Bloque de aluminio.

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

#### 4.1.4 Reactivos, soluciones y medios de cultivo

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

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

- Agua Peptonada Tamponada. (ISO 6579:2002) Frasco Schott x 500ml o en botella para dispensar.
- Caldo soya tripticasa o triptosa.
- Caldo Rappaport-Vaissiliadis con Soya (caldo RVS).
- Caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobioacina (caldo MKTTn).
- Agar Xilosa Lisina Deso-exicolato (XLD)
- Segundo medio selectivo según ISO 6579.
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI).
- Agar Hierro Lisina (LIA).
- Agar Movilidad Indol Omitina (MIO).
- Agar Tripticasa Soya (TSA).
- Antisuero Somático (O) Polivalente A-I para *Salmonella spp.* (Difco o Equivalente).
- Antisueños Somáticos (O) Monovalentes para *Salmonella spp.* (Grupos A-I). (Difco o Equivalente).
- Antisuero Flagelar (H) Polivalente para *Salmonella spp.* (Difco o Equivalente).
- API 20 E de Biomerieux u otro equivalente.
- Agua Clase 4.
- Solución de suero fisiológico al 0.85%.
- Solución de suero fisiológico al 0.85% con formalina al 0.6%.
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1%.

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

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

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

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

#### 4.1.5 Estándares

Se utilizarán como estándares dos cepas ATCC o de colecciones de referencia, una de *Salmonella spp.* H<sub>2</sub>S negativa y otra H<sub>2</sub>S positiva, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726.

Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo.

Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse las cepas ATCC recomendadas por el fabricante, tanto para controles positivos como controles negativos.

## 4.2 REQUISITOS DE PERSONAL DE LABORATORIO

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

### 4.2.1 Responsable técnico

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

- Título profesional del área biológica o afín, de preferencia Ingeniería Agronómica, Biología, Microbiología, Ingeniería en Alimentos, Bioquímica, Biotecnología. Con experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología, específicamente en análisis de alimentos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Dependiendo del Método de Diagnóstico solicitado a Autorizar por el SAG, haber recibido capacitación en Método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05 para determinación de *Salmonella* y/o Método Screening Assurance GSD *Salmonella* AFNOR TRA 02/12/01/09 y/o ISO 6579:2002, comprobable mediante el certificado correspondiente.

- Calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar. Deberá presentar un Informe que especifique los análisis realizados por el personal que se está postulando y los criterios escogidos para demostrar competencia.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

#### 4.2.2 Analistas

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

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

#### 4.3 REQUISITOS DEL PERSONAL PARA MUESTREO

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

##### 4.3.1 Jefe de equipo

El Jefe de equipo deberá cumplir con el siguiente perfil:

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

##### 4.3.2 Personal de apoyo

El personal de apoyo deberá cumplir con lo siguiente:

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

#### 4.4 REQUISITOS ESPECÍFICOS

El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de Norma-ISO 17.025, versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN u otro organismo de acreditación, en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos.

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

El Laboratorio debe contar con los siguientes documentos:

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

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

#### 4.5 MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS

El laboratorio solicitante deberá presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad, implementado en el laboratorio. Además, si el laboratorio cuenta con la acreditación en NCh-ISO 17025, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos, deberá presentar la documentación de respaldo.

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

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

- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas (flujo de áreas limpias y sucias) y ubicación de equipos.
- Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención y calibración de éstos.
- Lista de materiales, reactivos y Kits.
- Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance.
- Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista (titular y subrogante).
- Certificado de título del Responsable Técnico y su subrogante, en original o fotocopia legalizada.
- Certificado de título de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Documentos que acrediten la capacitación tanto de/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Documentos que acrediten la competencia técnica tanto de/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Instructivos especificados en el numeral 4.4 de este Instructivo.

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

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

### 5 DESCRIPCIÓN DEL MUESTREO Y ANALISIS

#### 5.1 CAPTACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Producto	Observaciones	Unidades por muestra	Cantidad muestras
Fruta fresca	Frutos extra grandes, piña, melón, entre otros.	1-2 U	5
	Frutos grandes, Naranjas, Granadas, Uva de mesa, entre otros.	5-10 U	5



	Frutos de tamaño medio, ciruelas, damascos, duraznos, entre otros.	10 U	5
	Fruta de tamaño pequeño, arándano, frutilla, frambuesa, entre otros.	500g	5
Fruta deshidratada	Pasas, entre otros.	500g	5
Hortalizas	En caso de unidades compactas, asimilar, la cantidad por muestra, a la fruta fresca, de acuerdo a su tamaño.	1-2 U 5-10 U 10 U 500g	5
	En caso de hortalizas de hoja, tales como puerro, perejil, espinaca, entre otros.	500g	5

## 5.2 INCORPORACIÓN COMO USUARIO AL SISTEMA INFORMÁTICO SAG

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

## 5.3 TRASLADO O ENVÍO DE MUESTRAS

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

## 5.4 RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA

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

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

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

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

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

## 5.5 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA Y PRE-ENRIQUECIMIENTO NO SELECTIVO

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

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

**NOTA:** Cabe señalar, que una vez realizado el paso anterior, se debe sembrar en forma paralela una cepa *Salmonella spp* H<sub>2</sub>S negativa y otra H<sub>2</sub>S positiva, cada una en tubos con 10 ml de APT, como control positivo del método.

## 5.6 METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO

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

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

#### 5.6.1.1 Enriquecimiento selectivo

- Transferir 0.1±0.02 ml desde el frasco con APT con la muestra incubada, a un tubo con 10 ml de Caldo SX2.
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella spp.* H<sub>2</sub>S negativa y H<sub>2</sub>S positiva), ambas en cada tubo de enriquecimiento respectivo.

- Incubar a 41.5±1°C durante 22–26 horas.

#### 5.6.1.2 Introducción de los datos de la tarjeta MLE

- Cuando se abra un nuevo lote, las especificaciones (o datos de la curva base de calibración) deben ser introducidos en el sistema (VIDAS® o mini VIDAS®) con la ayuda de la tarjeta de lote patrón MLE (ficha de especificaciones) incluida en cada caja. Si esta operación no se efectúa antes de comenzar los tests, el sistema no podrá editar los resultados. Estas especificaciones se introducen sólo una vez para cada lote.
- Es posible introducir las especificaciones manualmente o de forma automática gracias a la tarjeta MLE.

#### 5.6.1.3 Calibración

- La calibración, utilizando el estándar suministrado en la caja, debe efectuarse con cada nuevo lote que se abra, después de introducir las especificaciones del lote patrón. Además, se debe efectuar una recalibración cada 14 días.
- Esta operación permite ajustar la curva de calibración a cada aparato y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo.
- El estándar, identificado por S1, será analizado por duplicado (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV ("Relative Fluorescent Value") fijados. Si no es así, la media no será memorizada: Repetir una calibración.

#### 5.6.1.4 Realización del test

- Sacar únicamente los reactivos necesarios, dejarlos 30 minutos a temperatura ambiente antes de su utilización.
- Utilizar un cartucho "SLM" y un "cono SLM" para cada muestra, control o estándar a analizar. Verificar que la bolsa de conos ha sido bien cerrada después de cada utilización.
- Teclar o seleccionar "SLM" sobre el sistema para introducir el código del test. El estándar identificado obligatoriamente por "S1", debe analizarse por duplicado. Si el control positivo tiene que analizarse, se identificará por "C1" y si tiene que analizarse el control negativo, se identificará por "C2".
- Homogeneizar bien el estándar, los controles y las muestras a analizar, con un mezclador tipo vortex.
- Es indispensable inactivar las muestras al Baño-María o bloque calefactor VIDAS durante 15 minutos antes de realizar el test VIDAS® EASY SLM.
- Transferir 1-2ml del caldo SX2 incubado a un tubo. Cierre el tubo. Hierva durante 15 ± 1 minutos a 95 - 100 ° C. Enfríe el tubo. Agite el caldo hervido y transfiera 0,5 ml al pocillo de la muestra del cartucho VIDAS®.
- Si usa el bloque calefactor VIDAS Heat & Go, transferir 0,5 ml (500µl) del caldo SX2 al pocillo de la muestras del cartucho VIDAS. Caliente durante 15 ± 1 minutos, quite el cartucho del bloque, deje enfriar durante 10 minutos.
- Mantenga el caldo SX2 sin inactivar a 2-8 ° C por si fuera necesario llevar a cabo una confirmación.

**Nota:** El Caldo SX2 no hervido/calentado puede conservarse por 72 horas a 2-8°C. El test VIDAS y la confirmación de resultados positivos debe realizarse dentro de las 72 horas siguientes a la finalización de la incubación del caldo selectivo a 41.5±1°C.

- Coloque los pocillos y los conos en el equipo VIDAS siguiendo el orden de identificación creado en la pantalla del equipo.
- Efectúe el test VIDAS de acuerdo a las indicaciones de operación del equipo de acuerdo a instrucciones del fabricante.
- Conserve el registro de resultados del equipo.
- Todos los resultados positivos deben ser confirmados a partir del caldo SX2
- Dispensar 500µl de estándar, muestra y controles en el pocillo de muestra del cartucho.
- Colocar en el sistema los conos y los cartuchos.
- Verificar bien la concordancia de los códigos (colores y letras) entre el cono y el cartucho.
- Lanzar el análisis (ver Manual de Utilización). Todas las etapas están controladas automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en aproximadamente 45 minutos.
- Al finalizar el análisis, retirar los conos y los cartuchos del sistema utilizando guantes estériles desechables.
- Eliminar los conos y cartuchos utilizados en un recipiente apropiado, resguardando las normas de bioseguridad.

#### 5.6.1.5 Resultados e interpretación

- Una vez finalizado el test, los resultados son analizados automáticamente por el sistema.
- El equipo efectúa dos medidas de fluorescencia en la cubeta de lectura para cada muestra analizada.
- La primera lectura mide el ruido de fondo de la cubeta de substrato antes de ponerse en contacto con el cono.
- La segunda lectura se efectúa después de la incubación del substrato con la enzima del interior del cono.
- El RFV (Relative Fluórese Value) se calcula mediante la diferencia entre la lectura del ruido de fondo y la lectura del resultado final. Este cálculo aparece en la hoja de resultados.
- El RFV obtenido para cada muestra es interpretado por el sistema VIDAS® de la siguiente manera:

$$\text{Valor del test} = \text{RFV muestra} / \text{RFV estándar}$$

- Umbral e interpretación de los resultados:

Valor del test	Interpretación
< 0.23	Negativo
≥ 0.23	Positivo

- Se imprime una hoja de resultados sobre la cual figuran:
  - El tipo de ensayo realizado.
  - La identificación de la muestra.
  - La fecha y la hora.
  - El número de lote y fecha de caducidad del kit.
  - El RFV, el valor del test y el resultado con su interpretación por muestra.
- Un resultado con un valor de test inferior al umbral indica que la muestra no contiene antígenos de *Salmonella*, o contiene antígenos de *Salmonella* en una concentración por debajo del umbral de detección.
- Un resultado con un valor del test superior o igual al valor umbral indica que la muestra contiene antígenos de *Salmonella*.

Todos los resultados positivos emitidos por el test VIDAS<sup>®</sup>, se consideran como **presuntivos** y deben ser confirmados por el método tradicional de cultivo, de acuerdo a lo señalado en el punto 5.7.

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

#### 5.6.1.6 Control de calidad

- Un control positivo y un control negativo se incluyen en cada caja de reactivos VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella*.
- Los controles deben ser analizados inmediatamente después de la apertura de una nueva caja, con el fin de garantizar la ausencia de alteración de los reactivos.
- También es necesario comprobar cada calibración mediante el uso de estos controles. El equipo sólo podrá comprobar los valores de control identificados con C1 y C2.

No se podrán validar los resultados si los valores de control desvíasen de los valores esperados.

Nota: Es responsabilidad del usuario garantizar que el control de calidad se realiza conforme a la legislación local en vigor.

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

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

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

Delimite tres áreas de trabajo:

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

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

#### 5.6.2.1 Realización del test

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

- Enfríe el bloque de aluminio a 2-8°C al menos 20min antes de su uso. Coloque los tubos de amplificación en el bloque. Selle bien el envase para preservar los viales no utilizados.
- Abra las tapas de los tubos de amplificación y dispense 10µl de la polimerasa diluida con fecha vigente en cada uno utilizando una pipeta repetidora y una punta de 0,2ml. Este paso debe realizarse solo 15min antes de su uso.
- Transfiera 20µl de cada muestra y controles desde la placa de resuspensión hasta los tubos de amplificación usando una micropipeta multicanal. Asegúrese de no permitir la presencia de burbujas en el volumen transferido. Cierre firmemente las tapas.
- Antes de colocar los tubos en el carrusel del equipo GDS, invierta la placa con un brusco movimiento, verificando que se vea el contenido del vial en la tapa. Realice la operación inversa para devolver el contenido al fondo del tubo.
- Numere cada vial de las series de 4 y coloque en el carrusel.
- Todo el proceso realizado con las muestras debe realizarse también en las cepas control *Salmonella spp.* H<sub>2</sub>S positivas y H<sub>2</sub>S negativas, por tanto cada conjunto de muestras procesadas simultáneamente deberá registrar en su reporte los resultados de las cepas control.
- Opere el equipo de acuerdo a las indicaciones del manual y las entregadas en el curso de capacitación.
- Una vez terminada la corrida, retire los viales y elimine sin abrirlos para evitar la contaminación con productos de la amplificación. Para ello elabore un instructivo para desechar el material contaminado de acuerdo a la información proporcionada por el fabricante del kit.

### 5.6.2.2 Resultados e interpretación

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

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

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

### 5.6.3 Microbiología Tradicional basada en ISO 6579

#### 5.6.3.1 Enriquecimiento selectivo

- Utilizar para el enriquecimiento caldo Rappaport-Vissiliadis con Soya (caldo RVS) y caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobiocina (caldo MKTTn).
- Traspasar 0,1ml ± 0.02 ml desde el frasco con APT con la muestra incubada, a un tubo con 10 ml de caldo RVS. Incubar 41,5°C±1°C por 24 horas ±3 horas.
- Traspasar 1ml ± 0.2 ml desde el frasco con APT con la muestra incubada, a un tubo con 10 ml de caldo MKTTn. Incubar 37°C±1°C por 24 horas ±3 horas.
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella spp.* H<sub>2</sub>S negativa y H<sub>2</sub>S positiva), ambas en cada tubo de enriquecimiento respectivo.

#### 5.6.3.2 Desarrollo del test

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

### 5.7 CONFIRMACIÓN

En el caso del método Screening VIDAS® EASY SLM AFNOR BIO 12/16-09/05, la confirmación podrá realizarse a partir de los tubos SX2 hasta 72 horas del término de su incubación si son mantenidos entre 2 a 8 °C. Deben confirmarse todos los resultados positivos obtenidos con el VIDAS® EASY Salmonella.

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

#### 5.7.1 Aislamiento en agar selectivo

- Agitar los tubos de Enriquecimiento, utilizando el agitador o Vortex.
- Introducir el asa de aro en el interior del tubo y con abundante inóculo, sembrar por agotamiento sobre:
  - Agar XLD y un segundo Agar complementario para *Salmonella spp.* En el caso de Microbiología Tradicional basada en ISO 6579:2002 o confirmación del Método Screening GDS Salmonella.
  - Agar SM2 chromID Salmonella y un segundo Agar complementario para *Salmonella spp.* En el caso de Método Screening VIDAS®.
- No subdividir las placas. Identificar las placas sembradas.
- Finalmente continuar con la siembra de las cepas controles (*Salmonella spp.* H<sub>2</sub>S negativa y H<sub>2</sub>S positiva), ambas en los dos medios selectivos.
- Incubar las placas a 37±1°C o de acuerdo a la información del fabricante del medio empleado.
- Examinar las placas dentro de 18 a 24hrs. Seleccionar 1 a 5 colonias de acuerdo a la presentación característica de las colonias de *Salmonella spp.* en cada agar. Las colonias a confirmar deben ser marcadas e identificadas para tener trazabilidad a los resultados de la identificación bioquímica y serológica.
  - SM2 *chromID* Salmonella: colonias rosadas a malva, de apariencia lisa y de bordes netos.
  - Agar XLD: colonias negras o rojas con o sin centro negro. El borde o margen de la colonia podría permanecer amarillo dentro de las 24 horas, posteriormente debería virar a rojo.
  - Otro medio complementario: de acuerdo a las características indicadas por el fabricante.

- Almacenar, bajo refrigeración todas las placas desde donde se seleccionaron colonias. Si el resultado de las colonias sospechosas es negativo, y si es apropiado, repicar nuevamente colonias desde las placas refrigeradas para una nueva confirmación.

### 5.7.2 Pruebas bioquímicas

- Seleccionar a lo menos una colonia típica o sospechosa de cada medio selectivo y posteriormente cuatro si la primera es negativa, para realizar las pruebas bioquímicas. Esto debe realizarse antes de que cualquier muestra sea informada como ausencia de *Salmonella spp.*
- Inocular cada una de las colonias en TSI, LIA, MIO y TSA. Para la metodología basada en ISO 6579:2002, además de las pruebas bioquímicas anteriores, se deben realizar las pruebas Urea, VP (Voges Proskauer) y ONPG.
- Tocar suavemente **la superficie y el centro de la colonia** sospechosa con el asa en punta, luego inocular el TSI en profundidad y estría en superficie. Sin flamear nuevamente, inocular el tubo de agar LIA, pinchando dos veces en profundidad y hacer estría en superficie. Luego inocular el MIO en picadura y por último, inocular dos tubos de agar TSA en estría en la superficie.
- Una vez finalizado el paso anterior, se deben realizar las baterías bioquímicas para las cepas controles del método.
- Uno de los tubos de agar TSA se ocupa para realizar la confirmación serológica y el otro se debe mantener en refrigeración para ser enviado a confirmación del aislamiento.
- Incubar todos los medios utilizados para la batería bioquímica a 37±1°C por 24±2hrs.

Nota: Para el método VIDAS<sup>®</sup>, en caso de resultados discordantes, se recomienda seguir el siguiente protocolo adicional: transferir 0,1ml de caldo enriquecimiento en 10ml de caldo RVS, incubar 18-20hrs a 41,5±1°C, aislar sobre agares selectivos.

#### 5.7.2.1 Interpretación de las pruebas bioquímicas

Cuadro N°2: Interpretación de las pruebas bioquímicas

Medio	Prueba	Resultado
Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)	Fermentación de la glucosa	Fermenta la glucosa: Fondo Amarillo (A).
		No fermenta la glucosa: Fondo rojo (K).
	Fermentación de la lactosa y/o sacarosa	Fermenta estos azúcares: Tendido Amarillo (A).
		No fermenta: Tendido rojo (K).
	Producción de gas	Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
		No produce: Sin cambios.
Producción de H <sub>2</sub> S	Produce H <sub>2</sub> S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).	
	No produce: Sin cambios.	
Agar Hierro Lisina (LIA)	Descarboxilación de la lisina	Descarboxila la lisina: Fondo y tendido púrpura (K/K).
		No descarboxila la lisina: Fondo amarillo (A).
	Producción de gas	Produce gas: Ruptura o desplazamiento del agar.
		No produce gas: sin cambios.
	Producción de H <sub>2</sub> S	Produce H <sub>2</sub> S: Ennegrecimiento del medio (intensidad variable).
		No produce H <sub>2</sub> S: Sin cambios.

	Desaminación de la lisina	Desamina la lisina: Tendido rojo (R).
		No desamina: Tendido púrpura (K).
Agar Movilidad Indol Omitina (MIO)	Movilidad	Los microorganismos inmóviles sólo crecen en la línea de siembra y los móviles se reconocen por su desarrollo difuso alejado de la línea de inoculación.
	Descarboxilación de la Omitina	Descarboxila la omitina: Coloración azul, de intensidad variable.
		No descarboxila la Omitina: Coloración amarilla.
	Producción de Indol <sup>1</sup>	Produce Indol: Formación de un anillo rojo o rosado al agregar Reactivo de Kovacs.
No produce Indol: Anillo de color amarillo.		
Agar urea	Actividad de la Ureasa	Si la reacción es positiva se libera amonio desde la Urea, con lo cual cambia de color el indicador (rojo fenol) desde un color rosa a un fucsia profundo.
Disco ONPG	Detección de β-Galactidosa.	Positivo: observación de color amarillo en la suspensión. Negativo: la suspensión permanece sin cambio de color.
Caldo R.M.V.P. Reacción de Voges Proskauer <sup>2</sup>	Fermentación de la glucosa	La formación de un color rosa a rojizo dentro de 15min indica una reacción positiva.

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

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

Cuadro N°3: Resultado de las Pruebas Bioquímicas

Agar TSI			Agar LIA			Agar MIO						
TSI	GAS	H <sub>2</sub> S	LIA	GAS	H <sub>2</sub> S	Mov	Indol	Ornitina	Agar Urea	ONPG	VP	Microorganismo
K/A	+	+	K/K	-	+	+	-	+	-	-	-	<i>Salmonella</i> subespecie I Otras <i>Salmonella</i>
K/A	-	-	K/K	+	-	+	-	+	-	-	-	S. Choleraesuis Otras <i>Salmonella</i>
K/A	-	+	K/K	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Salmonella</i> Typhi
K/A	+	-	K/A	+	-	+	-	+	-	-	-	<i>Salmonella</i> spp. S.Paratyphi A.
K/A	-	-	K/A	-	-	+	-	+	-	-	-	S.Paratyphi A.

K/A	-	+	K/A	-	+	-	-	+	-	-	-	S. Typhi (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> spp. <i>Citrobacter freundii</i> *

\* Puede dar reacciones similares.

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

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

- Para la confirmación serológica se toma al menos una colonia por placa que cumpla con las pruebas bioquímicas características para el género *Salmonella* spp, de acuerdo a lo descrito en Punto 5.7.2.1 Cuadro N°3.
- Se ocupa uno de los tubos de agar tripticasa soya (TSA) inoculados junto a la batería bioquímica. Se suspende el cultivo con aproximadamente 5 ml de solución salina al 0.85%.
- Confrontar sobre la placa de vidrio para aglutinación, mediante el uso de gotarios estériles, una gota de suspensión del cultivo con una gota del suero somático polivalente A-I. Como control agregar solamente una gota de suspensión del cultivo para detectar si se produce **autoaglutinación** de la cepa estudiada.
- Mezclar con asa desechable.
- Mover la placa de vidrio para aglutinación con 20 vueltas de vaivén observando la presencia de grumos con una lámpara contra fondo oscuro.
- Si la cepa **autoaglutina**, **NO** puede ser seroagrupada y necesita pruebas bioquímicas adicionales, tales como las proporcionadas por API 20 E.
- Si la cepa no aglutina con el suero polivalente, puede deberse a la presencia de cápsula, por lo cual debe hervirse 15 minutos a una hora en baño de agua (tiempo que puede tardar en romper la cápsula). Después se debe confrontar nuevamente una gota del suero polivalente con una gota de suspensión del cultivo tratado por calor.
- Si las cepas aglutinan con el suero polivalente, corresponden al género *Salmonella* spp. Posteriormente, para identificar el **serogrupo**, se debe repetir el procedimiento descrito anteriormente, realizando aglutinaciones con los sueros monovalentes somáticos, desde el grupo A hasta el I.
- Si la cepa **NO aglutina** con ningún suero monovalente somático y posee pruebas bioquímicas características de *Salmonella* spp., debe continuarse con la serología flagelar.

### 5.7.4 Confirmación basada en la identificación del antígeno polivalente flagelar (H) de *Salmonella*

- Inocular el cultivo proveniente del agar TSA en 5 ml de Caldo tripticasa soya (CTS). Incubar a  $35^{\circ} \pm 1^{\circ}$  C durante 18 a 20 horas o hasta que el desarrollo bacteriano alcance una densidad aproximada de 3 en la escala de Mc Farland.
- Adicionar al CTS inoculado, 5 ml de solución salina que contenga 0.6% de formalina y dejar reposar 1 hora. En dos tubos distribuir 1 ml de esta preparación (colocar 0.5 en cada tubo).
- Luego, a uno de los tubos agregar 0.5 ml de antisuero polivalente H a dilución de trabajo, de acuerdo a instrucciones del fabricante. El otro tubo usarlo como control de autoaglutinación.

**NOTA:** Ejemplo: Antisuero Flagelar H, polivalente A-Z Difco, se utiliza en una dilución 1:25. Añadiendo 0.1 ml de antisuero reconstituido a 2.5 ml de solución de NaCl al 0.85%. Realizar esta dilución al momento de su uso. Al mezclar cantidades iguales de antisuero diluido y aislado de prueba, la dilución final es de 1:100.

- Incubar ambos tubos a  $48^{\circ} - 50^{\circ}$  C en baño de agua hasta 1 hora. Evitar agitarlos en exceso.
- Sacar los tubos del baño termostático evitando agitarlos en exceso antes de efectuar la lectura de la reacción.
- Efectuar la lectura del tubo utilizado como control de autoaglutinación para verificar la presencia de flocúlos. 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 flocúlos. Su presencia indica un resultado **positivo**. Su ausencia indica un resultado **negativo**.
- Opcionalmente, se puede usar el Test de Látex para *Salmonella* de Oxoid (seguir las instrucciones del fabricante).
- Registrar presencia o ausencia de aglutinación.

### 5.8 CÁLCULO Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

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

Si las reacciones bioquímicas son típicas de *Salmonella* spp. y las pruebas serológicas con antisuero somático (O) polivalente son negativas y positivas con el antisuero flagelar polivalente (H), se informa como **Presencia de “*Salmonella* spp. no A – I”**.

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

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

En caso de *Salmonella spp.* positiva, una vez que se haya seroagrupado la cepa, el responsable del Laboratorio debe enviarlas, adjuntando la información de los resultados de las pruebas bioquímicas e identificándola con el número de muestra y número de Protocolo consignado en el Protocolo Oficial original, al Instituto de Salud Pública para realizar la confirmación del aislamiento. Este envío debe ser efectuado en un lapso no mayor de 10 días, desde la fecha de obtención de la cepa.

Los costos involucrados en los análisis realizados por el Instituto de Salud Pública serán financiados por el Laboratorio Autorizado.

## 5.9 VARIACIÓN DE LA METODOLOGÍA

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

## 6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS

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

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

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

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

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

## 7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

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

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

La renovación de la autorización quedará supeditada a la emisión de un informe, que indique que el Laboratorio Autorizado no posee No Conformidades que afectan el desempeño, conforme a las especificaciones contenidas en los Instructivos Técnicos y Reglamento Especifico de Autorización.

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

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

## 8 OBLIGACIONES

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

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

## 9 FORMULARIOS

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



3. La presente resolución y los citados instructivos técnicos, entrarán en vigencia a contar de la fecha de publicación de la presente resolución en el Diario Oficial.
4. La presente resolución y los instructivos técnicos, estarán a disposición de los usuarios en el sitio Web del Servicio Agrícola y Ganadero ([www.sag.cl](http://www.sag.cl)), conforme a lo dispuesto en el artículo 7, letra j) de la Ley N° 20.285 sobre acceso a la Información Pública.

ANÓTESE, COMUNÍQUESE Y PUBLÍQUESE

**ANGEL SARTORI ARELLANO**  
DIRECTOR NACIONAL SERVICIO AGRÍCOLA Y  
GANADERO

**Anexos**

Nombre	Tipo	Archivo	Copias	Hojas
IT muestreo y diagnóstico de Escherichia coli en prod. hortofrutícolas de exportación	Digital			
IT muestreo y diagnóstico de Salmonella spp. en prod. hortofrutícolas de exportación	Digital			

OCIVBM/MPF/VBM/AMRJ/VLAR/CCS/CCS

Distribución:

- Oscar Humberto Camacho Inostroza - Subdirector Servicio Agrícola y Ganadero - Or.OC
- Vanessa Alejandra Bravo Maldonado - Jefe/a Departamento Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros - Or.OC
- Michel Agredo Salazar - Jefe Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias - Servicio Agrícola y Ganadero - Or.OC
- Roberto Antonio Mir Loyola - Jefe (S) División Protección Agrícola y Forestal - Or.OC
- Marisol Raquel Paez Flores - Jefa División Jurídica - Or.OC
- Ernesto Alejandro Torres Carrazana - Jefe División Auditoría Interna - Or.OC
- Jeanete Susana Franco Navarrete - Jefa Departamento de Comunicaciones y Participación Ciudadana - Or.OC
- Julio Cerda Cordero - Director Regional Región Aysén Servicio Agrícola y Ganadero - Or.XI
- Angélica Genoveva Vivallo Vivallo - Directora Regional Región de Antofagasta Servicio Agrícola y Ganadero - Or.II
- Olga Aros Domínguez - Director Regional (S) Servicio Agrícola y Ganadero Región Metropolitana de Santiago - Or.RM
- Ricardo Enrique Porcel Rivera - Director Región de Arica y Parinacota Servicio Agrícola y Ganadero - Or.AyP
- Jorge Esteban Fernandez Gonzalez - Director Regional Región de Coquimbo Servicio Agrícola y Ganadero - Or.IV
- María Isabel Sanchez Lopez - Directora Regional Región Magallanes y Antártica Chilena Servicio Agrícola y Ganadero - Or.XII
- Jaime Enrique Peña Cabezón - Director Regional Región del Bio-Bio Servicio Agrícola y Ganadero - Or.VIII
- Andres Ricardo Duval Gunckel - Director Regional Región de Los Lagos - Servicio Agrícola y Ganadero - Or.X
- Eduardo Jorge Figueroa Goycolea - Director Regional (TyP) Servicio Agrícola y Ganadero Región de La Araucanía - Or.IX
- Juan Rodrigo Sotomayor Cabrera - Director Regional Región de O'Higgins Servicio Agrícola y Ganadero - Or.VI
- César Cardozo Rojas - Director Regional Región de Tarapacá Servicio Agrícola y Ganadero - Or. Tarapacá

- Cristian Ricardo Lara Gutierrez - Director Regional TyP Región del Maule Servicio Agrícola y Ganadero - Or.VII
- Jorge Octavio Oltra Comte - Director Regional SAG Dirección Regional de Los Rios - Or.Lros
- Francisca Herrera Monasterio - Directora Regional (T y P) Dirección Regional de Valparaiso - Or.V
- Juan Carlos Valencia Bustos - Director Regional Región de Atacama - Servicio Agrícola y Ganadero - Or.III

Servicio Agrícola y Ganadero - Av. Presidente Bulnes N° 140 - Teléfono: 23451101



El presente documento ha sido suscrito por medio de firma electrónica avanzada en los términos de la Ley 19.799 (Sobre Documentos Electrónicos, Firma Electrónica y Servicios de Certificación de dicha Firma), siendo válido de la misma manera y produciendo los mismos efectos que los expedidos por escrito y en soporte de papel, con firma convencional.

El documento original está disponible en la siguiente dirección

url:<http://firmaelectronica.sag.gob.cl/SignServerEsign/visualizadorXML/C5E9E2DBBAAB09D736F7150ACA9ED432BAB6BFA3>