



PROTOCOLO DE ENSAYO DE APTITUD

INN-ID-MA05/B-2024: DETECCIÓN DE *Salmonella* spp. EN LECHE EN POLVO

Este programa es desarrollado con aportes del Fondo de Innovación para la Competitividad, del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.

Coordinado por la División Metrología del Instituto Nacional de Normalización, INN

INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE
DEPARTAMENTO NACIONAL Y DE REFERENCIA EN SALUD AMBIENTAL
SUBDEPARTAMENTO DE METROLOGÍA
LABORATORIO DESIGNADO DE MICROBIOLOGÍA Y QUÍMICA DE ALIMENTOS Y AGUAS

INN-ID-MA05/B-2024- Versión 00 –Agosto 2024

CONTENIDO

1)	Identificación del ensayo de aptitud	3
2)	Requisitos de participación	4
3)	Seguridad, responsabilidad y compromiso del laboratorio	5
4)	Descripción del ítem de ensayo	5
5)	Puntos de medición	6
6)	Confabulación entre los participantes o la falsificación de resultados	6
7)	Recepción, transporte y/o devolución del ítem de ensayo de aptitud	6
8)	Instrucciones sobre condiciones de almacenamiento y manipulación del ítem de ensayo	7
9)	Confidencialidad y codificación a cada laboratorio participante	8
10)	Descripción de la metodología a utilizar en las mediciones y/o análisis	9
11)	Desarrollo	9
12)	Recepción de los resultados obtenidos	10
13)	Evaluación estadística	10
14)	Reposición del ítem de ensayo correspondiente al mensurando perdido, dañados y medidas en caso de atraso.	11
15)	Informe preliminar (B).	11
16)	Taller de cierre	11
17)	Informe final (A)	11
18)	Bibliografía	12
19)	Anexos	12

1) Identificación del ensayo de aptitud

- **Introducción**

La División de Metrología del INN, coordina las actividades involucradas en la operación de un Programa de Ensayo de Aptitud Nacional (*Proficiency Testing – PT's*), a cargo de la Red Nacional de Metrología (RNM) con la finalidad de poner esta actividad al servicio de los laboratorios de ensayo y calibración del país.

Desde el año 2010, la RNM ofrece un Programa de Ensayos de Aptitud el cual es parte del "Programa de Fortalecimiento y Reconocimiento de las Mejores Capacidades de Medición en la Red Nacional de Metrología", Programa desarrollado con aportes del Fondo de Innovación para la Competitividad, del Ministerio de Economía, Fomento y Turismo.

El Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) es el encargado de realizar todas las actividades involucradas en la operación de este Programa de Ensayo de Aptitud, con la finalidad de situar esta actividad al servicio de los laboratorios de ensayo y calibración del país.

La ronda de ensayo de aptitud para detección de *Salmonella* spp. tiene como objetivo evaluar el desempeño de los laboratorios que realizan la detección de este patógeno en alimentos, responsable de brotes de salmonelosis y que además es de vigilancia sanitaria en varios grupos de alimento y se encuentra organizada conforme a los requisitos ISO/IEC 17043.

- **Objetivo**

Evaluar el desempeño y competencia de los laboratorios participantes para realizar ensayos en detección de *Salmonella* spp., así como también evaluar el desempeño continuo de los laboratorios acreditados.

- **Identificación del proveedor de ensayo de aptitud**

El proveedor del ensayo de aptitud, es el Laboratorio Designado en Química y Microbiología de Alimentos y Aguas en la Magnitud de Cantidad de Sustancia "microorganismos patógenos en alimentos y aguas", del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), perteneciente a la Red Nacional de Metrología, ubicado en Marathon 1000, Ñuñoa, Santiago de Chile.

- **Coordinación**

El programa de Ensayo de Aptitud Anual, es coordinado por el Laboratorio Designado en Química y Microbiología de Alimentos y Aguas en la Magnitud de Cantidad de Sustancia "microorganismos patógenos en alimentos y aguas" del Departamento Nacional y de Referencia en Salud Ambiental del ISP.

Contactos:

Coordinador de Ensayo de Aptitud del ISP y Proveedor de Ensayo de Aptitud del LD:

QF. María Natalia Gutiérrez Vargas / Dra. Francis Alarcón Rodríguez

Teléfono : 56-2-25755531

Email : mgutierrez@ispch.cl / falarcon@ispch.cl

- **Subcontrataciones**

No se contratan actividades relacionadas con los ensayos de aptitud. A excepción del transporte de la encomienda ítem de ensayo que se realiza a través del servicio de despacho dispuesto por el Instituto de Salud Pública de Chile para los laboratorios nacionales.

2) Requisitos de participación

El laboratorio que participe en el presente ensayo de aptitud, deberá contar con el equipamiento, condiciones ambientales y conocimientos mínimos necesarios para la realización del ensayo de detección de *Salmonella* spp.

El número máximo de participantes es 10.

Los Laboratorios internacionales que desean participar, deberán asumir los costos para transportar el ítem de ensayo y gastos de aduana si es que son necesarios.

Los Laboratorios que no cumplan con los requisitos técnicos en relación con sus capacidades de medición del Ensayo de Aptitud, serán notificados por parte del ISP de su NO INCORPORACIÓN, explicando los motivos que respaldan dicha decisión.

El cronograma y fechas plazo del ensayo aptitud se indican a continuación:

ACTIVIDAD	FECHA
Fecha Inicio de Inscripciones	20/08/2024
Plazo final envío de Formularios de Inscripción	06/09/2024
Notificación a Laboratorios inscritos y aceptados	13/09/2024
Envío de muestras a los participantes	08/10/2024
Plazo final envío de resultados por parte de los Laboratorios Participantes	05/11/2024
Entrega Informe Preliminar de Resultados	29/11/2024
Plazo final envío de observaciones y apelaciones al Informe Preliminar	06/12/2024
Entrega Informe Final de Resultados	09/12/2024
Taller de Cierre	13/12/2024

Se solicitará al laboratorio participante completar el envío del Formulario de Participación, antes de la fecha señalada en sitio web de metrología (<https://www.inn.cl/rnm-pean-2024>) como plazo de postulación.

El FORMULARIO DE INSCRIPCIÓN debe ser enviado a mgutierrez@ispch.cl y falarcon@ispch.cl.

La División de Metrología del INN promueve la realización de intercomparaciones, a través de los Laboratorios Designados de la Red Nacional de Metrología, RNM. El Sistema Nacional de Acreditación debe mantenerse informado de la oferta existente de programas de ensayo de aptitud, realizados por la Red Nacional de Metrología, para tener esta información a disposición de los laboratorios acreditados o en proceso de acreditación (DA-D01 INN).

3) Seguridad, Responsabilidad y Compromiso del laboratorio

En el caso de cualquier daño, o pérdida del ítem de ensayo por la manipulación del laboratorio participante, este no será repuesto. El laboratorio deberá informar por correo electrónico a las profesionales del ISP a los correos mgutierrez@ispch.cl y falarcon@ispch.cl de esta situación.

4) Descripción del ítem de ensayo- material de ensayo

Este material está dirigido a Laboratorios de ensayo que realicen análisis microbiológicos en matriz alimento y dispongan de metodología validada/verificada para el análisis de detección *Salmonella* spp. en matriz láctea.

El material de la intercomparación, se denomina; "Ítem de ensayo de Aptitud para Detección de (Presencia/Ausencia) de *Salmonella* spp." consiste en una porción homogénea de 25 g ± 0,1 g de leche en polvo que contiene una concentración conocida de un microorganismo liofilizado.

El material de ensayo se dispone en un envase plástico estéril, etiquetado y codificado. Debiendo ser almacenado a temperaturas menores o iguales a -18°C. Este material ha sido elaborado y evaluado por los test de homogeneidad y estabilidad conforme a los requisitos ISO 17034:2016 por el Laboratorio Designado en Química y Microbiología de Alimentos y Aguas en la Magnitud de Cantidad de Sustancia "Microorganismo patógenos en alimentos y aguas".

En caso de no recibir el material de ensayo dentro de 5 días hábiles desde la fecha establecida como fecha de envío en el cronograma, por favor contactarse con las profesionales del ISP a los correos mgutierrez@ispch.cl y falarcon@ispch.cl.

5) Puntos de medición

Capacidad de detectar o no detectar el analito, es decir; “Presencia” o “Ausencia” de *Salmonella* spp.

6) Confabulación entre los participantes o falsificación de resultados

La necesidad de confianza constante en el desempeño de los laboratorios no sólo es esencial para los laboratorios y sus clientes sino también para otras partes interesadas, tales como las autoridades reguladoras, el organismo de acreditación, y otras organizaciones que especifican requisitos para los laboratorios”. Si se sospecha de confabulación entre los participantes o la falsificación de resultados, se aplicarán los procedimientos correspondientes. Si los resultados de la investigación confirman que existe confabulación entre los participantes o la falsificación de resultados, se dará aviso de manera inmediata al organismo nacional de acreditación, que radica en el Instituto Nacional de Normalización (INN) y a la autoridad reglamentaria correspondiente, si procede.

7) Recepción, transporte y/o devolución, embalaje del ítem de ensayo de aptitud.

a) Recepción:

Será obligación del laboratorio participante informar el arribo de la muestra del ensayo de aptitud, enviar foto a la llegada de la encomienda del ítem de ensayo a las profesionales del ISP a los correos mgutierrez@ispch.cl y falarcon@ispch.cl, adjuntando además la “Hoja de Acuso recibo conforme enviada con la encomienda.

b) Transporte:

Se utiliza gel refrigerante y/o hielo seco para conservar y mantener la cadena de frío durante el transporte, evitando así que pueda verse afectada la integridad de la muestra. La muestra está acompañada de un testigo de temperatura (frasco que contiene glicerol o glicerina), el cual debe abrir inmediatamente después de recepcionada la encomienda para luego introducir en él un termómetro con el objetivo de medir la temperatura de recepción del ítem de ensayo. Registrar el valor medido.

La temperatura aceptada al momento de la recepción del ítem de ensayo, se encuentra en un rango de $<-18^{\circ}\text{C}$ a 8°C . Sin embargo, por tratarse de un material liofilizado y conforme a estudios realizados, si supera los 15°C por un máximo de 3 días desde la fecha de despacho, debe **RECHAZAR** la Muestra e informar inmediatamente a las profesionales del ISP a los correos mgutierrez@ispch.cl y falarcon@ispch.cl, del rechazo del ítem de ensayo junto con el respaldo respectivo (control de temperatura del testigo de temperatura).

c) Embalaje:

El ítem de ensayo está empacado en un frasco estéril, cerrado, y dentro de un envase secundario, correspondiente a una bolsa plástica cerrada, dentro de un envase terciario de poliestireno expandido (EPS) con la finalidad de proteger la integridad de la muestra hasta la recepción en destino.

No corresponde devolver las encomiendas de los ítems de ensayos recepcionadas en mal estado (rechazadas), estas deberán ser eliminadas por el Laboratorio como residuo biológico. A su vez, solicitar una nueva muestra vía mail a las profesionales del ISP a los correos mgutierrez@ispch.cl y falarcon@ispch.cl, adjuntando imágenes del estado de la muestra rechazada.

8) Instrucciones sobre condiciones de almacenamiento y manipulación del ítem de Ensayo:

a) Al recepcionar la muestra:

- El participante deberá revisar si la muestra se encuentra sin daños físicos en cuanto a su embalaje (en buen estado, etiqueta legible, sin roturas y cerrado), almacenar a ≤ -18 °C, hasta su análisis. Tomar nota del estado, fecha de recepción y hora y registrar en “Hoja de Acuso recibo conforme”.
- Verificar el código de la muestra.
- Utilizar elementos de protección personal (delantal, guantes estériles, cofia, mascarilla, cubre calzado, etc.) para la manipulación del material biológico.
- Asegurar que las paredes externas del envase se encuentren limpias antes de proceder a abrir el material para evitar contacto con la piel.
- Se debe utilizar para el ensayo el contenido total de muestra enviado.

b) Reconstitución Material Ensayo de Aptitud:

- a) Retirar el frasco del congelador o lugar de almacenamiento.
- b) Mantener a temperatura ambiente 15 minutos aproximadamente.
- c) Abrir el frasco en forma aséptica utilizando elementos de protección personal.
- d) No fraccionar la muestra. La cantidad contenida corresponde a la totalidad de muestra requerida para realizar la reconstitución.
- e) Verter todo el contenido del vial (es decir los $25 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$) a un contenedor o bolsa estéril, agregar $225 \pm 2 \text{ mL}$ del diluyente o caldo enriquecido que su laboratorio utilice para el método de rutina para obtener una suspensión inicial de 1:10 (puede dejar una cantidad de diluyente para enjuagar el vial)
- f) Asegúrese que todo el contenido del vial fue liberado al diluyente.
- g) Dejar unos minutos para hidratar completamente.
- h) Agitar para homogeneizar adecuadamente.
- i) Seguir el procedimiento de análisis conforme a su método de rutina.
- j) El tiempo desde la reconstitución no debería exceder los 30 minutos.

c) Manipulación del ítem de ensayo.

En relación a las medidas de seguridad al manipular el ítem de ensayo se deberá:

- Utilizar elementos de protección personal adecuados: Guantes protectores, delantal de bioseguridad, cofia y gafas protectoras, para la manipulación de sustancias biológicas.

- Los viales contienen microorganismos liofilizados potencialmente infecciosos. Debe ser utilizado solo por personal calificado en laboratorio microbiológico de acuerdo a las normas nacionales de seguridad. Evite la producción de aerosoles. Abra los viales lejos de la cara.
- Medidas de Primeros Auxilios: Las bacterias potencialmente infecciosas que pueden ingresar al cuerpo vía inhalación, ingestión, contacto ocular y piel.
 - i. Ingestión: Busque asistencia médica inmediata
 - ii. Ojos: Enjuague abundantemente, busque asistencia médica inmediata
 - iii. Piel: Lave el área afectada con sustancia bactericida para manos Inhalación: Desplace al individuo a un área de aire fresco y busque asistencia médica inmediata.
- Medidas contra fuego: Utilice dióxido de carbono estándar, extinguidores químicos secos o agua. Se recomienda el uso de aparato de respiración independiente y ropa protectora.
- Medidas para controlar derrames o fugas: Notifique a todo el personal que trabaje en las dependencias cercanas. Utilice equipamiento protector adecuado. Absorba la sustancia derramada con material absorbente adecuado.
- Todo material de desecho que contenga microorganismos debe ser tratado como material de riesgo biológico. Limpie el derrame y sanitice el área con etanol al 70%, alcohol isopropilo al 70% o cloro.

El material contiene microorganismos del grupo de riesgo 2 de acuerdo al Comité Asesor de Patógenos peligrosos (HSE 1998- ISBN0717610381). Un organismo del grupo 2 puede causar enfermedad en humanos y puede ser de riesgo para los trabajadores de laboratorio sin embargo es baja la probabilidad de que se disemine en la comunidad. Las exposiciones en laboratorio rara vez producen infecciones y generalmente se dispone de tratamiento efectivo.

Para la eliminación de la muestra o residuos generados en el ensayo, se debe realizar de acuerdo a las directrices pertinentes de eliminación de residuos con riesgo biológico.

9) Confidencialidad y codificación a cada laboratorio participante

El participante recibirá un código alfanumérico correlativo de identificación de Laboratorio.

Este código alfanumérico será entregado por las profesionales del ISP mediante correo electrónico al participante, una vez confirmada y aceptada su participación en el Ensayo de Aptitud.

Este código alfanumérico será el que debe utilizar como código de identificación del laboratorio.

Cabe destacar que el código asignado es confidencial, y es exclusivamente conocido por las profesionales del ISP y el laboratorio participante.

Los resultados propios de cada laboratorio serán comunicados en forma individual, sin embargo, tanto el nombre de los laboratorios participantes como los resultados globales, serán de conocimiento público en informe final con dicha codificación.

10) Descripción de la metodología a utilizar en las mediciones y/o análisis

a) Preparación de ítem de ensayo correspondiente al mensurando.

Una vez reconstituido el material como se indica en el punto 8.b), los participantes deben preparar y/o acondicionar el ítem de ensayo de aptitud como indican sus métodos rutinarios de análisis de laboratorio para procesar las muestras.

b) Condiciones ambientales:

Las condiciones ambientales de temperatura para la realización del ensayo en el laboratorio son de 16 a 27°C. El Laboratorio deberá informar en el formulario de Resultados las condiciones ambientales pertinentes durante el análisis.

c) Método de Ensayo:

El laboratorio podrá optar por utilizar el o los métodos de ensayo habituales que estime conveniente para la realización del ensayo de aptitud.

11) Desarrollo

El desarrollo de las actividades relacionadas con el ensayo de aptitud “MA05/B Detección de *Salmonella* spp. en leche en Polvo” es la señalada a continuación y las fechas de cada actividad se encuentran señaladas en el punto N°2 del presente Protocolo.

1. Publicación de la Programación anual de los EA, ofrecidos por la RNM, en el sitio web: <https://www.inn.cl/rnm-pean-2024>.
2. Publicación de Protocolo y Formulario de Inscripción del EA, en sitio web: <https://www.inn.cl/rnm-pean-2024>.
3. Proceso de inscripción de los laboratorios participantes, mediante envío de formulario.
4. Recepción de formularios de inscripción.
5. Recepción de las muestras o patrones por cada Laboratorio participante del EA.
6. Envío de códigos asignados por correo electrónico a cada Laboratorio participante.
7. Elaboración del Programa de mediciones de cada EA, según corresponda.
8. Desarrollo del Ensayo de Aptitud (desarrollo experimental de las mediciones).
9. Recepción de los resultados del Ensayo de Aptitud.
10. Elaboración, revisión y envío del Informe Preliminar a los participantes.
11. Reunión Final (Taller de Cierre), opcional.
12. Envío de Informe Final a los participantes.

12) Recepción de resultados obtenidos

El participante recibirá adjunto a la encomienda una planilla denominada “Planilla de Resultados”. Esta planilla debe ser llenada con letra legible y toda la información indicada (*) debe ser llenada obligatoriamente:

- La planilla de resultado tiene 1 página en la cual se informan los datos del laboratorio y los resultados de todas las lecturas obtenidas de la muestra de ensayo (ítem de ensayo).
- Los datos solicitados en la planilla corresponden al o los resultados obtenidos en la determinación del analito, es decir, detectado o no detectado, presencia o ausencia. El laboratorio debe reportar y describir en la planilla de resultados el método analítico utilizado por el laboratorio y su referencia normativa (si corresponde).
- El laboratorio deberá reportar las condiciones ambientales de temperatura durante el análisis.
- El informe de resultados **no deberá** indicar el nombre del laboratorio, timbra o pie de firma que pueda indicar o revelar el nombre del laboratorio participante.
- Para mencionar a los analistas o de quién reporta los resultados utilice las iniciales de responsabilidad de cada uno.

Al llenar la planilla de resultados, asegúrese que los datos sean ingresados correctamente, revíselos antes de firmar.

Los resultados deberán enviarse vía correo electrónico en el plazo del cronograma establecido a los correos electrónicos mgutierrez@ispch.cl y falarcon@ispch.cl. No se considerará el reporte de resultados fuera de la fecha indicada o enviada a otra persona.

Nota: Se recibirán solo aquellos resultados que estén en la planilla definida, con los antecedentes obligatorios completos y dentro de la fecha o plazo establecida.

Siga las instrucciones indicadas en este documento para la adecuada manipulación de la muestra de ensayo. Al realizar el análisis, manejo de datos y/o cálculos, revise cuidadosamente los resultados obtenidos, antes de informarlos.

13) Evaluación estadística

Los resultados deben ser 100% coincidentes con el valor de referencia.

De este modo si son coincidentes se evalúan como desempeño “Satisfactorio”, y los resultados no coincidentes con el valor de referencia como desempeño “No satisfactorio”.

Valor informado	Valor asignado	
	Presencia	Ausencia
Presencia	Satisfactorio	No satisfactorio
Ausencia	No satisfactorio	Satisfactorio

14) Reposición de ítem de ensayo correspondiente al mensurando (ítem de ensayo) perdido, dañado y medidas en caso de atraso

En caso de pérdida del ítem de ensayo durante el traslado desde el LD-RNM (ISP) al laboratorio participante, el laboratorio deberá informar en un plazo no superior a 5 días la no recepción del ítem de ensayo, y de este modo se le hará llegar una nueva muestra.

Cualquier inconveniente en la recepción del envío; en cuanto a documentos, alteración del estado de la muestra, cantidad de muestra, etc. debe ser informado a la brevedad a las Profesionales del ISP a través de los contactos señalados en el punto de "Coordinación" siguiendo las directrices señaladas en el punto N°7 letra c) del presente Protocolo.

15) Informe Preliminar (B)

El Proveedor del ensayo aptitud preparará el Informe Preliminar B, el cual se hará llegar a cada laboratorio para su revisión y comentarios, si procede. Los comentarios y observaciones de los participantes en relación con los contenidos del informe, deberán ser notificados en un plazo máximo de 5 días hábiles, a partir de la fecha de envío del informe preliminar.

El informe preliminar podrá ser enviado por la(s) profesional(es) del ISP a cada participante.

El informe preliminar incluirá el resultado de todos los laboratorios participantes, excepto aquellos que enviaron resultados fuera de plazo.

16) Taller de Cierre

Para finalizar el ensayo de aptitud, los participantes serán invitados a asistir de modo presencial o virtual según sea la necesidad, al taller de cierre. Durante esta instancia se expondrán los resultados generales de la ronda de ensayo de aptitud y se analizarán según la evaluación realizada. La información sobre el Taller de Cierre será publicada oportunamente en la página de la División de Metrología del INN: <https://www.inn.cl/rnm-pean-2024>.

17) Informe final (A)

Con las observaciones que correspondan aplicar, se generará un informe final "A" que será enviado por la(s) profesional(es) del ISP a cada participante y además será publicado en el sitio web de metrología <https://www.inn.cl/rnm-pean-2024>.

En este informe se entregan los resultados de todos los laboratorios participantes identificados con el código asignado a cada laboratorio. El informe describe el listado de participantes, objetivo del ensayo de aptitud, el ítem de ensayo y la evaluación realizada. La evaluación de desempeño de los participantes es representada en tablas y gráficas, según sea necesario.

El informe final será enviado por la(s) profesional(es) del ISP (QF. María Natalia Gutiérrez Vargas o Dra. Francis Alarcón Rodríguez) a cada participante o publicado en el sitio Web <https://www.inn.cl/rnm-pean-2024>.

18) Bibliografía

- ISO/IEC 17043:2010 Traducción Oficial. Evaluación de la Conformidad- Requisitos generales para los ensayos de aptitud
- Guía RNM-01 "Elaboración de protocolo para ensayo de aptitud organizados por la Red Nacional de Metrología- División de Metrología del INN.
- DA- D01- Directrices para la participación en ensayos de aptitud y otras comparaciones para laboratorios-División de Acreditación del INN.

19) Anexos

Para informarse de este y otros ensayos de aptitud organizados por la Red Nacional de Metrología (RNM). Visite la página WEB de la División de metrología del INN en <https://www.inn.cl/rnm-pean-2024>.

Para mayor información sobre el laboratorio designado (LD) del Instituto de Salud Pública de Chile, visite el sitio WEB: www.ispch.cl