



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

ORGANIZACIÓN ENSAYOS INTERLABORATORIALES SALMONELOSIS



Ensayos Interlaboratoriales de Detección e Identificación de *Salmonella*

2 anuales

- ✓ Para Laboratorios Oficiales: 24 laboratorios
- ✓ Para Laboratorios Autorizados para los Programas Nacionales de Control de *Salmonella*: 34 laboratorios

Ensayos Interlaboratoriales de Serotipado de *Salmonella* spp

1 anual

- ✓ Para laboratorios Oficiales+ Laboratorios Autorizados para los Programas Nacionales de Control de *Salmonella*: 38 laboratorios



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

ORGANIZACIÓN DE ENSAYOS INTERLABORATORIALES DE

DETECCIÓN DE *Salmonella* spp.
EN PRESENCIA DE
MICROORGANISMOS
COMPETITIVOS



DISEÑO DEL ENSAYO

ENSAYO CUALITATIVO. AUSENCIA/PRESENCIA de *Salmonella* spp

MATRICES

HECES AVIARES
libres de *Salmonella* spp

PIENSO
libre de *Salmonella* spp

TIPO DE MUESTRAS

Liofilizados de *S. Enteritidis*
10 UFC – 100 UFC

Liofilizados de *S. Mbandaka*
10 UFC -100 UFC

MÉTODO

ISO 6579:2002 Anexo D
(MSRV)

ISO 6579:2002 (RVS / MKTTn)

Método alternativo validado

Nº DE MUESTRAS

15 heces+liofilizado

8 pienso+ liofilizado



DISEÑO DEL ENSAYO

DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS

Muestras con Heces	Muestras con Pienso	Muestras Control Sin Matriz
3 S.Enteritidis 100 UFC	3 S. Mbandaka 100 UFC	1 S.Enteritidis 10 UFC
3 S.Enteritidis 10 UFC	3 S. Mbandaka 10 UFC	1 S.Typhimurium 10 UFC
3 S.Typhimurium 100 UFC	2 Blancos	1 S. Mbandaka 10 UFC
3 S.Typhimurium 10 UFC		1 Blanco
3 Blancos		
15 Muestras Heces	8 Muestras Pienso	4 Controles

27 muestras



PREPARACIÓN Y CONTROL DE MATERIALES DE ANÁLISIS

S.Typhimurium ATCC 14028, *S.Enteritidis* ATCC 49214, *S.Mbandaka*



Preparación de diluciones decimales en solución salina estéril



Recuento



Elección de la dilución apropiada en función de la concentración buscada



Dilución en buffer de liofilización (albúmina bovina, sacarosa y glutamato sódico)



Agitación en refrigeración durante aprox. 1h



Dispensado en viales estériles a razón de 1 ml / vial



Liofilización y conservación a -20°C

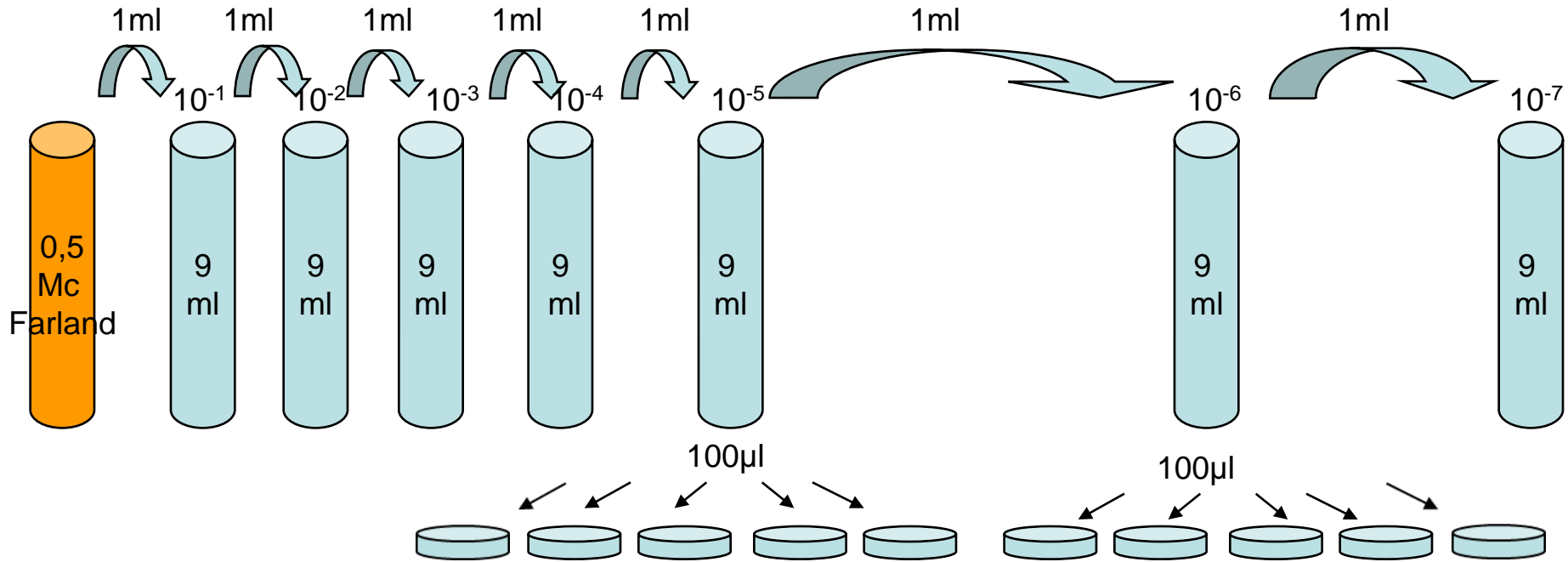


Control de concentración y homogeneidad del lote de viales



PREPARACIÓN Y CONTROL DE MATERIALES DE ANÁLISIS

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DECIMALES Y RECUENTO I



SE100	SE10	STM100	STM 10	SMB10	SMB100
-------	------	--------	--------	-------	--------



PREPARACIÓN Y CONTROL DE MATERIALES DE ANÁLISIS

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DECIMALES Y RECUENTO II

Ejemplo para preparar un lote de 10ufc

	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Placa 1		107	7	
Placa 2		128	10	
Placa 3		133	10	
Placa 4		105	8	
Placa 5		132	17	
Media UFC/100µl		121	10,4	
Media en UFC/ml	1,2X 10 ⁴	1,2 X10 ³	1,0X10 ²	X10

CONCENTRACIÓN FINAL: 10 UFC/ ml
(20 UFC para compensar pérdida por liofilización)

VOLUMEN FINAL: 160 ml

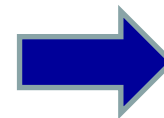
Necesitamos 160 ml x 20 UFC/ml = 3200 UFC

1210 UFC ——— 1 ml de 10⁻⁵
3200 UFC ——— x ml

X= 2,6 ml de 10⁻⁵

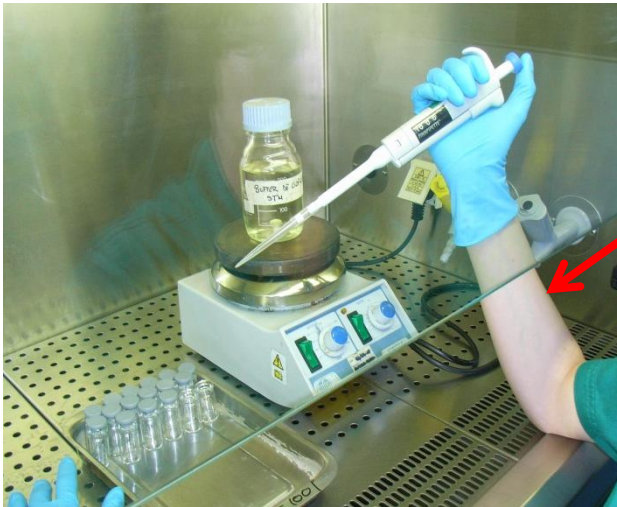
Preparamos una suspensión con :

2,6 ml de 10⁻⁵ + 157,4 ml de Buffer de Liofilización





PREPARACIÓN Y CONTROL DE MATERIALES DE ANÁLISIS



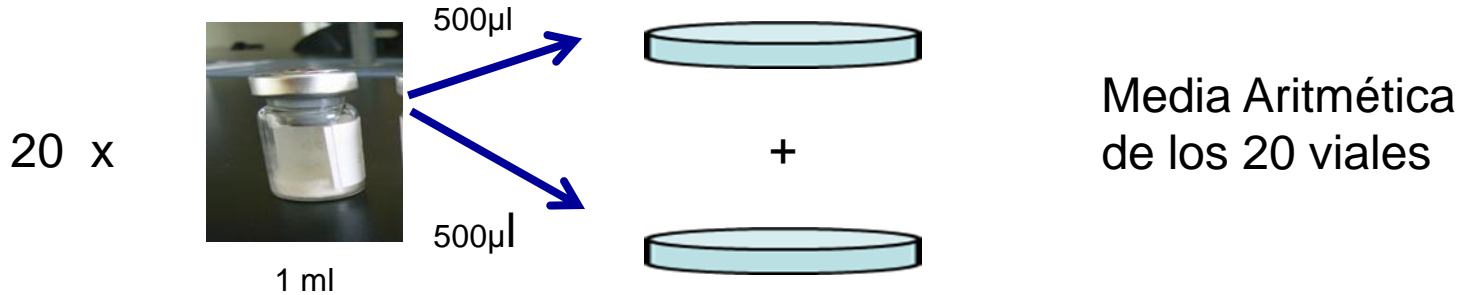
- ✓ Agitación durante al menos 1 hora en refrigeración.
- ✓ Dispensar en viales estériles dentro de cabina de flujo laminar: 1 ml/vial.
- ✓ Congelación a -80°C
- ✓ Liofilización y conservación a -20°C
- ✓ Control de concentración y homogeneidad del lote.





PREPARACIÓN Y CONTROL DE MATERIALES DE ANÁLISIS

CONCENTRACIÓN



HOMOGENEIDAD

Se calcula mediante el test T_2 que determina la variación entre muestras de diferentes viales procedentes del mismo lote. (Heisterkamp et al., 1993*)

$$T_2 = \sum_{i=1}^l \frac{\left(\frac{z_i - z_+}{l} \right)^2}{\left(\frac{z_+}{l} \right)}$$

$$\frac{T_2}{(l-1)} = 1$$

$$T_2 / (l-1) \leq 2.$$

z_i = nº de UFC en un vial

z_+ = suma de UFC en todos los viales examinados.

l = nº total de viales examinados



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO



- ✓ Recogida de heces frescas de explotación libre de *Salmonella*.
- ✓ Envío refrigerado en contenedores de seguridad como sustancia biológica Categoría B (UN3373).
- ✓ Establecimiento de fechas exactas para la realización del ensayo.



ACTUACIONES DURANTE LA REALIZACIÓN DEL ENSAYO

Caracterización de la matriz (heces aviares)

Recuento de Enterobacterias (ISO21528-2)

Recuento de Aerobios Mesófilos (ISO 4833)

Nuevo recuento de lotes de liofilizados para comprobar concentración y homogeneidad

Liofilizados	En el momento de preparación		Durante la semana del ensayo	
	Media UFC por vial	$T_2 / (I - 1)$	Media UFC por vial	$T_2 / (I - 1)$
SE 10	21,1	0,52	10,7	0,66
SE 100	117,2	0,4	97,8	1,1
STM 10	13,9	1,10	11,4	1,28
STM 100	113,1	0,65	85,5	0,93



EVALUACIÓN DE RESULTADOS – CRITERIOS DE EVALUACIÓN

MUESTRAS CONTROL

Todos los controles positivos se detectan como positivos

Todos los controles negativos se detectan como negativos

MUESTRAS CON HECES

De las muestras de concentración 100UFC se detectan al menos el 80%

De las muestras de concentración 10UFC se detectan al menos el 50%

De los blancos+ heces al menos el 80% son negativos

MUESTRAS CON PIENSO

De las muestras de concentración 100UFC se detectan el 100%

De las muestras de concentración 10UFC se detectan al menos el 80%

De los blancos+ pienso el 100% son negativos

Si el laboratorio no supera el ensayo de acuerdo a estos criterios:

- ✓ Se contacta con el laboratorio para identificar el problema
- ✓ Se envían muestras adicionales



TERCER ENSAYO INTERLABORATORIAL ORGANIZADO POR EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE SALMONELLOSIS ANIMALES PARA LABORATORIOS AUTORIZADOS PARA LA REALIZACIÓN DE AUTOCONTOLES

DETECCIÓN DE *SALMONELLA* EN HECES ANIMALES

NOVIEMBRE 2010



TERCER ENSAYO INTERLABORATORIAL ORGANIZADO POR EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE SALMONELLOSIS ANIMALES
DETECCIÓN DE *Salmonella* EN HECES ANIMALES. Noviembre 2010

LABORATORIO: LABROVET, S.L.

CÓDIGO: 01

Nº MUESTRA	CONTENIDO MUESTRA	RESULTADO ESPERADO	RESULTADO OBTENIDO POR EL LABORATORIO
1	SE10	POSITIVO	POSITIVO
2	STM100	POSITIVO	POSITIVO
3	STM10	POSITIVO	POSITIVO
4	BLANCO	NEGATIVO	NEGATIVO
5	SE10	POSITIVO	POSITIVO
6	SE100	POSITIVO	POSITIVO
7	STM100	POSITIVO	POSITIVO
8	SE100	POSITIVO	POSITIVO
9	STM100	POSITIVO	POSITIVO
10	STM10	POSITIVO	POSITIVO
11	BLANCO	NEGATIVO	NEGATIVO
12	SE100	POSITIVO	POSITIVO
C1	BLANCO	NEGATIVO	NEGATIVO
C2	STM10	POSITIVO	POSITIVO
C3	SE10	POSITIVO	POSITIVO
C4	Ni liofilizado ni heces	NEGATIVO	NEGATIVO
C5	Sólo heces	NEGATIVO	NEGATIVO

Criterios de Evaluación

Se considera que el laboratorio ha obtenido un buen rendimiento en el ensayo si:

- Todos los controles positivos se detectan como positivos: 2 de 2.
- Todos los controles negativos se detectan como negativos: 1 de 1.
- De las muestras con liofilizados "blancos" + heces al menos el 80% son negativas: Al menos 1 de 2.
- De las muestras de liofilizados SE100 y STM100 + heces, al menos el 80% son positivas: Al menos 2 de 3 (de cada tipo).
- De las muestras de liofilizados SE10 y STM10 + heces al menos el 50% son positivas: Al menos 1 de 2 (de cada tipo).

El laboratorio ha obtenido un buen rendimiento en el ensayo según los criterios de evaluación establecidos.

LA JEFA DE SERVICIO
DEPARTAMENTO DE SALMONELLOSIS

Fdo: Cristina de Prado Escobar

Vº Pº
LA DIRECTORA TÉCNICA
DEL I.º DE SANIDAD ANIMAL DEL LCV

Fdo: María Victoria





GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

ORGANIZACIÓN DE ENSAYOS INTERLABORATORIALES DE SEROTIPADO DE *Salmonella* spp.



DISEÑO DEL ENSAYO

- 15 cepas de *Salmonella* spp procedentes del cepario del LCV y correspondientes a ensayos interlaboratoriales organizados por el CRL.
- Diferenciar entre *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y “Otros serotipos”.
- Identificación de acuerdo a Esquema Kauffmann-White. Método usado habitualmente en el laboratorio (normalmente aglutinación con antisueros específicos)

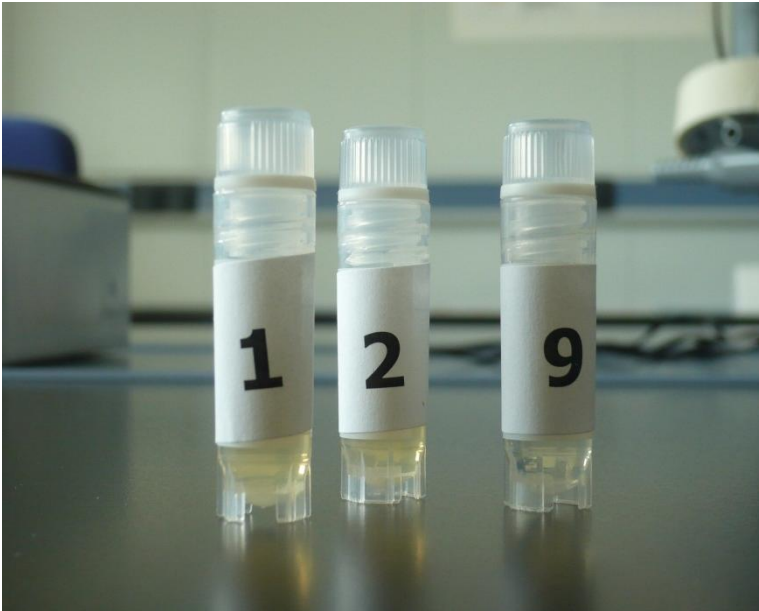


Nº CEPA	Serotipo	Fórmula
C1	S.Infantis	6,7, <u>14</u> : r : 1,5
C2	<i>S.Enteritidis</i>	<u>1,9,12</u> : g,m : -
C3	S.Havana	<u>1,13,23</u> : f,g [s]: -
C4	S.Virchow	6,7, <u>14</u> : r : 1,2
C5	<i>S.Typhimurium</i>	<u>1,4,[5]12</u> : i : 1,2
C6	S.Hadar	6,8 : z ₁₀ : e,n,x
C7	S. Colindale	6,7 : r : 1,7
C8	<i>S.Enteritidis</i>	<u>1,9,12</u> : g,m : -
C9	S.Berta	<u>1,9,12</u> : [f],g,[t] : -
C10	S.Ouakam	9,46: z ₂₉ : -
C11	<i>S.Typhimurium</i>	<u>1,4,[5]12</u> : i : 1,2
C12	S.Mikawasima	6,7, <u>14</u> : y : e,n,z ₁₅
C13	<i>S.Enteritidis</i>	<u>1,9,12</u> : g,m : -
C14	S. Istambul	8 : z ₁₀ : e,n,x
C15	S.Muenchen	6,8 : d : 1,2



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO



- ✓ Envío en tubos de agar.
- ✓ Transporte como sustancia biológica categoría B (UN3373).
- ✓ No refrigerado.



TERCER ENSAYO INTERLABORATORIAL ORGANIZADO POR EL
LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE SALMONELOSIS
ANIMALES

SEROTIPADO DE *SALMONELLA*

JUNIO 2010

TERCER ENSAYO INTERLABORATORIAL ORGANIZADO POREL LABORATORIO
NACIONAL DE REFERENCIA DE SALMONELOSIS ANIMALES.
SEROTIPADO DE *Salmonella*. JUNIO 2010

LABORATORIO: Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal. CECAV.
CÓDIGO: 31

Nº CEPA	RESULTADOS ESPERADOS			RESULTADOS CÓD. 31		
	Serotipo	Ag-O	Ag-H	Serotipo	Ag-O	Ag-H
C1	<i>S.</i> Infantis	6,7,14	r : 1,5	<i>Otro serovar</i>	-	-
C2	<i>S.</i> Enteritidis	1,9,12	g,m : -	<i>S.</i> Enteritidis	-	-
C3	<i>S.</i> Havana	1,13,23	f,g [s] : -	<i>Otro serovar</i>	-	-
C4	<i>S.</i> Virchow	6,7,14	r : 1,2	<i>Otro serovar</i>	-	-
C5	<i>S.</i> Typhimurium	1,4,[5]12	i : 1,2	<i>S.</i> Typhimurium	-	-
C6	<i>S.</i> Hadar	6,8	z ₁₀ : e,n,x	<i>Otro serovar</i>	-	-
C7	<i>S.</i> Colindale	6,7	r : 1,7	<i>Otro serovar</i>	-	-
C8	<i>S.</i> Enteritidis	1,9,12	g,m : -	<i>S.</i> Enteritidis	-	-
C9	<i>S.</i> Berta	1,9,12	[f],g,[t] :-	<i>Otro serovar</i>	-	-
C10	<i>S.</i> Ouakam	9,46	z ₂₀ : -	<i>Otro serovar</i>	-	-
C11	<i>S.</i> Typhimurium	1,4,[5]12	i : 1,2	<i>S.</i> Typhimurium	-	-
C12	<i>S.</i> Mikawasima	6,7,14	y:e,n,z15	<i>Otro serovar</i>	-	-
C13	<i>S.</i> Enteritidis	1,9,12	g,m : -	<i>S.</i> Enteritidis	-	-
C14	<i>S.</i> Istanbul	8	z ₁₀ : e,n,x	<i>Otro serovar</i>	-	-
C15	<i>S.</i> Muenchen	6,8	d : 1,2	<i>Otro serovar</i>	-	-

COMENTARIOS Y RECOMENDACIONES

La identificación de *S.* Enteritidis y *S.*Typhimurium ha sido correcta.

Los resultados del ensayo se consideran satisfactorios.

LA JEFA DE SERVICIO
DEPARTAMENTO DE SALMONELOSIS

Fdo: Cristina de Frutos Escobar

Vº Bº
LA DIRECTORA TÉCNICA
DEL Lº DE SANIDAD ANIMAL DEL LCV

Fdo: Mirta Lago Madrid





GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

Gracias