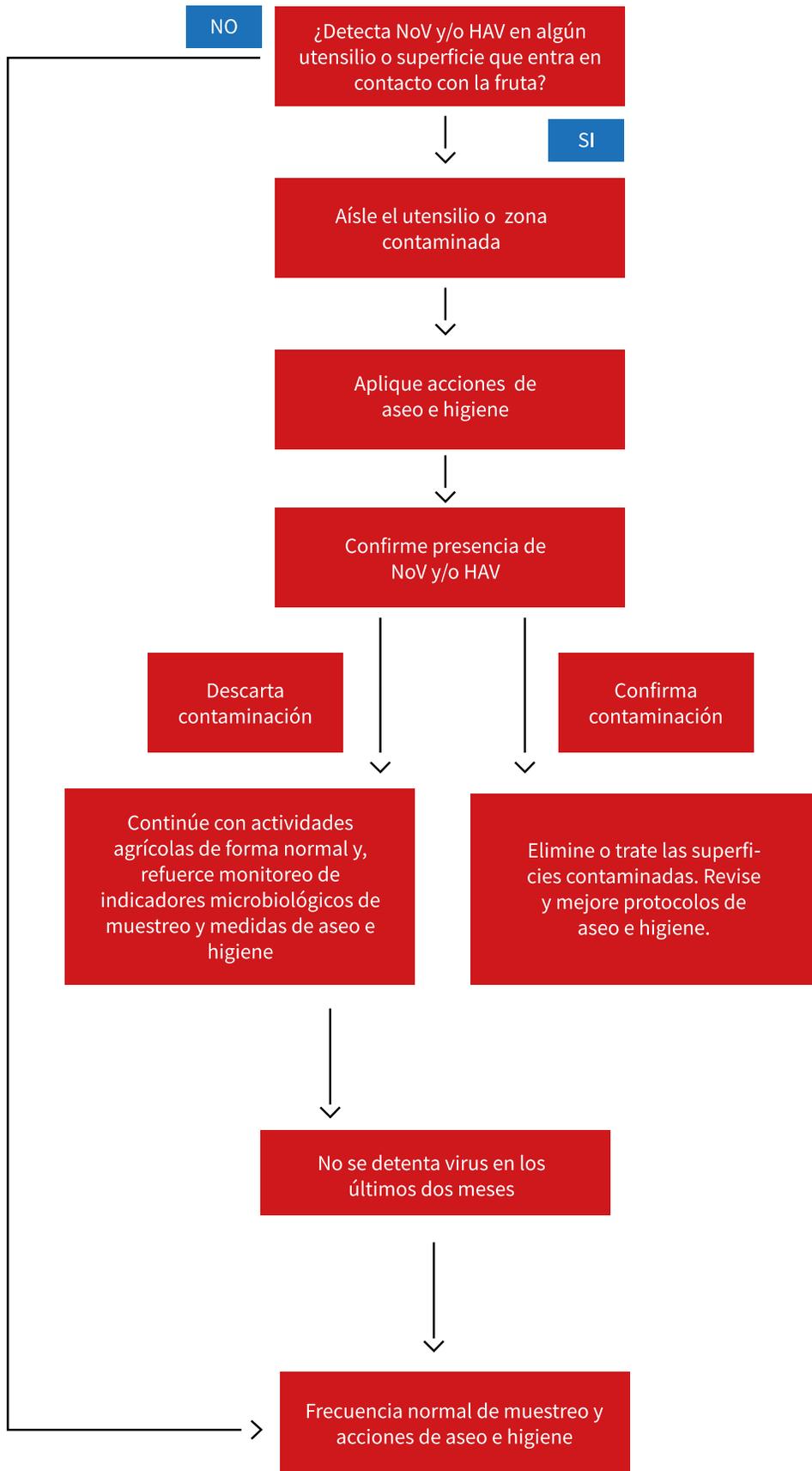
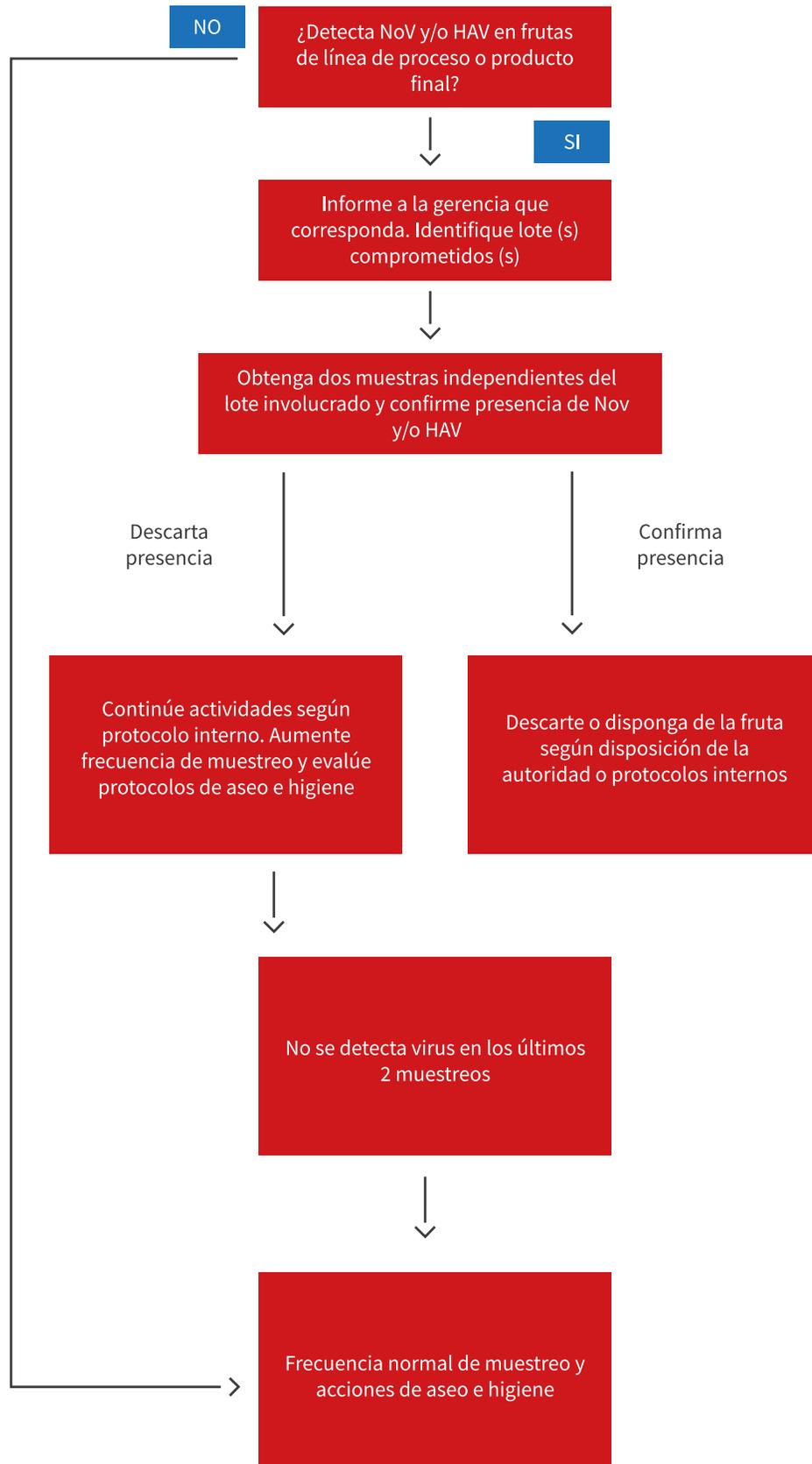


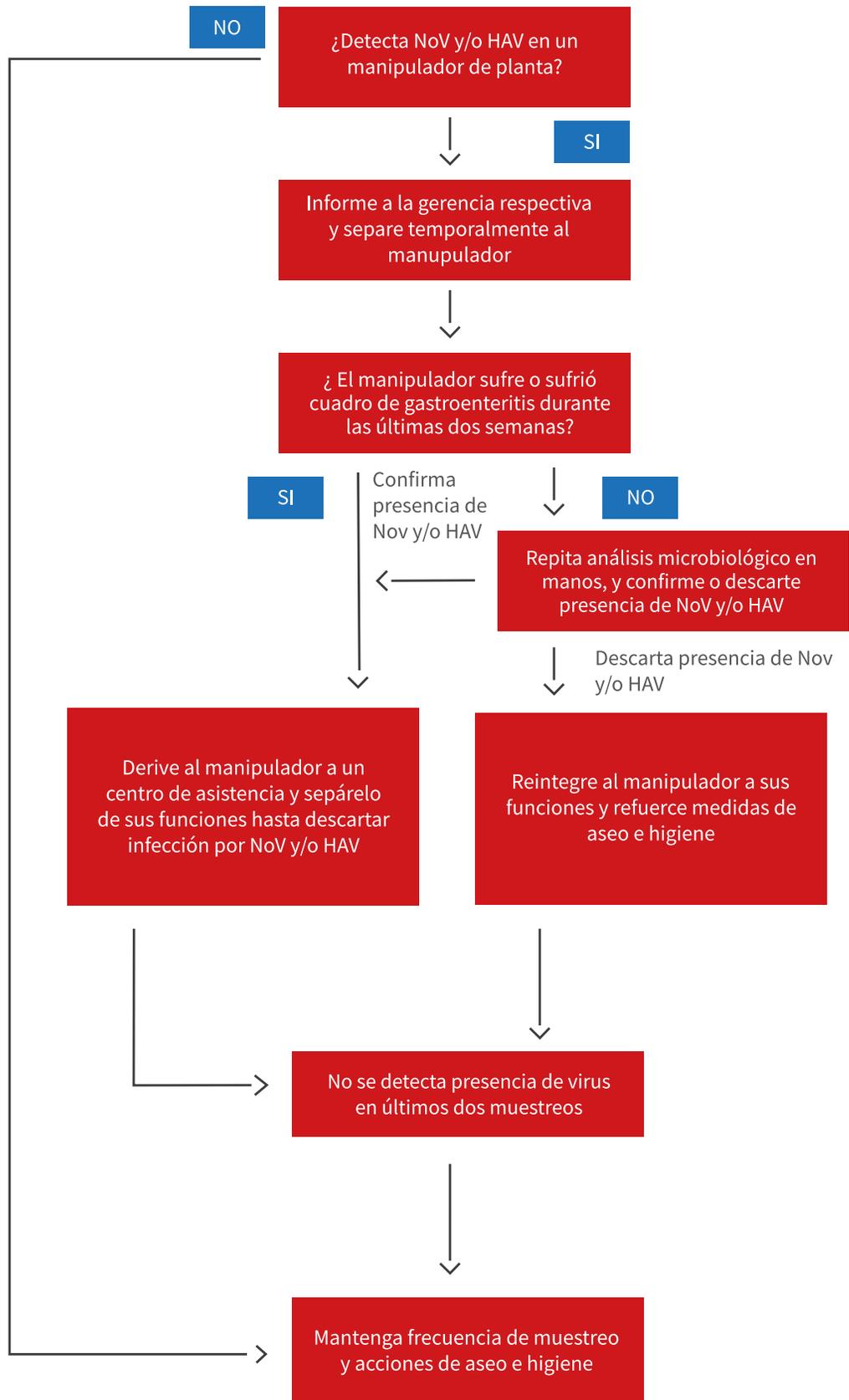
## EN CAMPO: SUPERFICIES



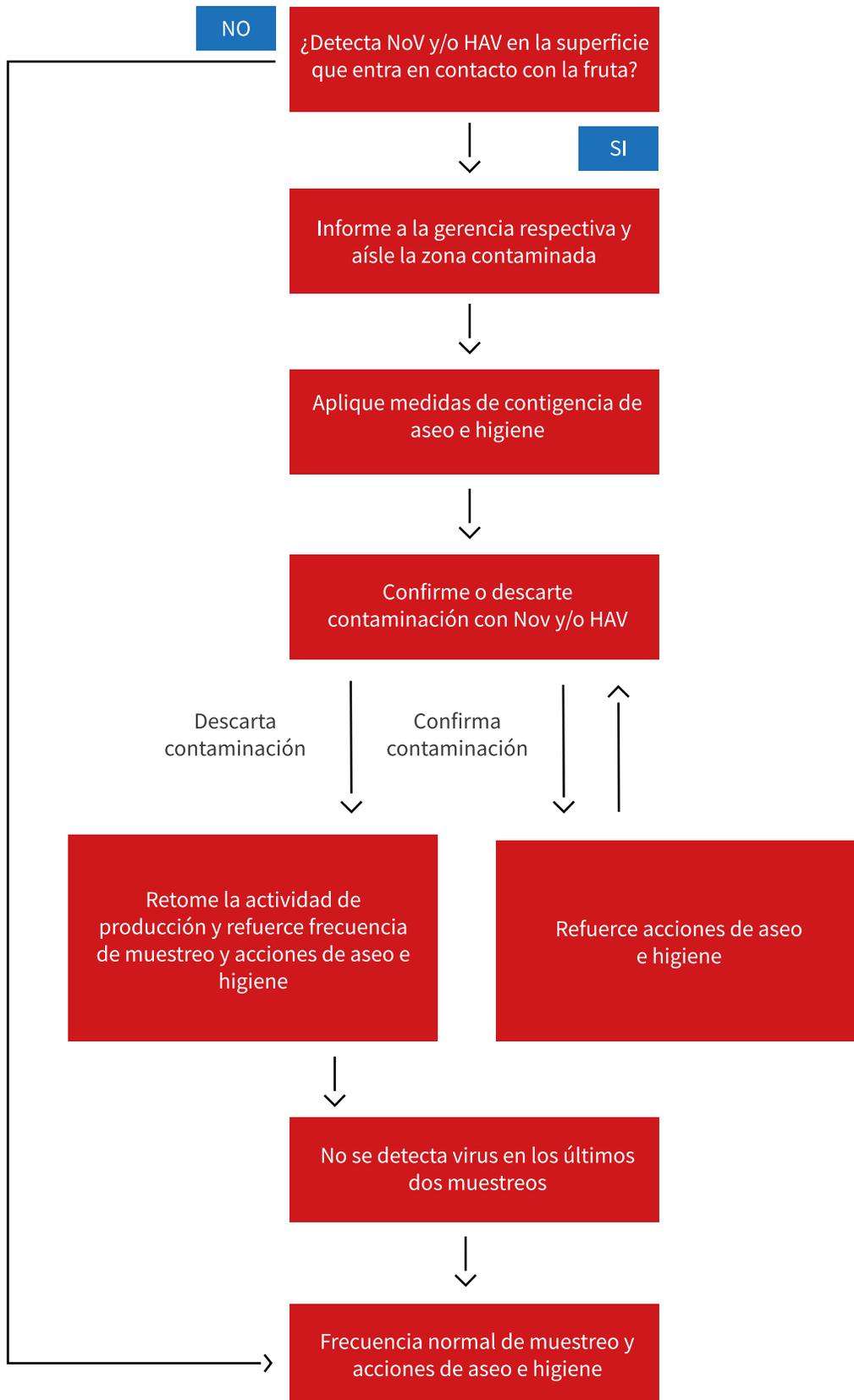
## EN PLANTA: FRUTA



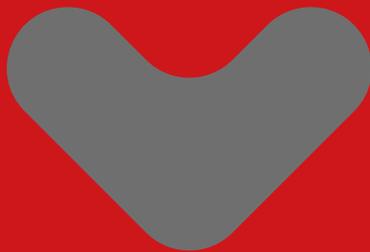
## EN PLANTA: MANIPULADOR



## EN PLANTA: SUPERFICIES



**PROCEDIMIENTO  
PARA LA OBTENCIÓN,  
CONSERVACIÓN Y  
TRANSPORTE DE  
MUESTRAS**



## **PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS**

La toma de muestras puede ser encargada a un tercero (ej. Laboratorio de servicios), o bien ser tomada por personal debidamente capacitado. Independiente de quien realice la toma de muestras, estas deben ser obtenidas cuidando la integridad y representatividad de la muestra, así como la conservación de la misma hasta su análisis.

En el mismo sentido, la muestra debe ser representativa de las condiciones en las que se encontraba el ítem de interés, al momento de tomar la muestra, por lo que hay que cuidar todos los aspectos que puedan alterar el estado de la muestra antes de su análisis. En el caso análisis microbiológico, es fundamental no contaminar la muestra y generar las condiciones de cadena de frío adecuadas, de forma que el resultado del análisis microbiológico de cuenta de la condición real del ítem de interés al momento de ser tomada la muestra, sólo de ésta forma la información entregada por el laboratorio permitirá tomar las medidas adecuadas para asegurar la inocuidad de la fruta.

### **Materiales para toma de muestras**

Para una correcta toma de muestras, el personal que toma la muestra debe estar debidamente

entrenado, y contar con el material y condiciones mínimas que exigen las BPTM (25). A modo de guía, a continuación se describen los principales materiales mínimos necesarios para una adecuada toma de muestra:

Toma de muestra desde superficies:

1. Tubos de ensayo con tapa (que evite derrame), estériles.
2. Tórulas estériles.
3. Tampón fosfato-salino (PBS) estéril (sólo para detección viral).
4. Agua Peptonada Tamponada 0.1% (en caso de muestreas para Coliformes fecales)

Toma de muestra de fruta:

1. Recipiente plástico rígido para transportar la fruta.

Toma de muestra de agua:

1. Bidones estériles (20L), con tapa.

Material uso general:

1. Guantes desechables estériles (tipo quirúrgicos).
2. Tijera u otro material cortante (estéril).
3. Etiquetas o cinta para rotular muestras.
4. Plumón indeleble.

5. Contenedor isotérmico (nevera).
6. Elementos refrigerantes para mantener el frío.
7. Material para proteger material de vidrio (diario, plástico acolchado, etc.)
8. Elementos de protección personal necesarias según condiciones ambiente de la zona de muestreo.

### Obtención de la Muestra

La selección de la muestra debe ser completamente al azar, para lo cual debe aplicar una norma que entregue las directrices necesarias como la norma chilena “Selección de muestras al azar” (NCh43), u otra que garantice que las muestras serán representativas del lote que se desea evaluar. El plan de muestreo debe ser generado de forma tal que permita establecer a lo menos la cantidad de muestras a analizar, la frecuencia de muestreo, criterios de aceptación o rechazo del lote evaluado; para lo cual debe aplicar alguna de las normas existentes y reconocidas como la norma chilena “Procedimientos de muestreo para inspección por atributos - Planes de muestreo indexados por nivel de calidad aceptable (AQL) para la inspección lote por lote” (NCh44), u otra que cumpla con las características técnicas y reconocimientos requeridos.

La toma de muestra debe ser realizada por personal del laboratorio debidamente entrenado (no todo el personal de un laboratorio está necesariamente entrenado para toma de muestras); o bien por personal del predio agrícola o la planta de proceso debidamente capacitado y entrenado.

La obtención de la muestra debe ser realizada según un protocolo definido para ello, si bien cada unidad encargada de la toma de muestras debe tener su propio protocolo, existen algunos criterios básicos y transversales que aseguran un adecuado proceso de toma de muestras:

a) El día de toma de muestra(s), verifique que cuenta con el material necesario para el número de muestras a obtener, y en condiciones de esterilidad; así mismo, que cuenta con elementos de protección personal y elementos que permitan higienizar utensilios y manos en caso de ser necesario. Asegúrese que cuenta con todo lo necesario para obtener, rotular, almacenar y transportar en forma adecuada todas las muestras a obtener.

b) El rótulo de la muestra debe ser claramente legible y dar cuenta de a lo menos: a qué corresponde la muestra, fecha y hora en que se obtiene la muestra, análisis al que

está destinada la muestra (NoV/HAV, Coliformes fecales u otro), lugar en que se toma la muestra (zona/predio/planta). En caso de utilizar códigos para la identificación de las muestras, asegúrese de tener por escrito la descripción detallada que corresponde a cada código utilizado. Para rotular utilice rotuladores de tinta indeleble (resistente a la humedad); si utiliza rótulos de papel como cintas o etiquetas, estas no deben despegarse en las condiciones de almacenamiento de la muestra (se recomienda pegar la cinta a temperatura ambiente, antes de tomar la muestra).

c) Para muestras de fruta, en el recipiente plástico recolectar aproximadamente 200-250g de frambuesas, esto corresponde a una muestra (n=1). Con esta cantidad se asegura material para detección viral y análisis microbiológicos además de las contra muestras necesarias. Para evitar contaminación o exceso de manipulación de la muestra, se recomienda recolectar una cantidad aproximada sin pesar ni ajustar la cantidad de muestra. Uso de guantes obligatorio.

d) Para muestras de agua, recolecte 20 litros de agua en el bidón estéril designado para esto, tratando de evitar en lo posible la recolección de otros elementos como hojas o barro. Un bidón de agua corresponde a una

muestra para una fuente específica, para cada fuente de agua de interés utilizar un bidón distinto.

e) Para muestras de superficies inertes, el uso de guantes es obligatorio. La tórula se toma por la parte superior del vástago evitando manipular el resto, humedezca la tórula en PBS si la muestra es con el fin de detección viral o APT 0.1% si la muestra será para análisis microbiológico, y presione contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido, posteriormente, en el caso de muestrear superficies inertes (mesones, cintas transportadoras, bandejas, etc.) frote el área designada en un área aproximada de 10cm<sup>2</sup> o lo que sea posible según sea el caso, pasando la tórula en 3 diferentes direcciones, por ultimo introduzca la tórula en un tubo estéril que contenga 0,5mL de PBS o APT 0,1% (según corresponda), y quiebre el extremo de la tórula dejándola caer en el tubo y quedándose con la parte por dónde sujetó la tórula. Tener en cuenta que para una misma muestra se pueden muestrear áreas cercanas para detección viral y análisis microbiológicos por separado. (Ver anexo 1)

f) Para muestras de manipulador, siga el mismo procedimiento y arrastre la tórula por la palma del manipulador, zonas interdigitales (entre los dedos), y por las huellas

dactilares, el lecho ungueal (debajo de las uñas) y el dorso de la mano, pudiendo usar la misma tórula para ambas manos, pero nunca una misma tórula para más de un manipulador. En el caso de que se necesite una muestra compuesta por más de un manipulador, se deberá usar una tórula por cada uno de ellos, reuniéndolas en el mismo tubo. Deposite la tórula en tubo estéril que contenga 1mL de PBS o APT 0,1% (según corresponda), siguiendo el procedimiento descrito en (e).

g) Una vez tomada la muestra se debe almacenar de entre 2-8°C y enviar lo más pronto posible al laboratorio, manteniendo la cadena de frío hasta su recepción.

h) Una vez recepcionada la muestra en el laboratorio, será el responsable técnico del laboratorio quien determine la aptitud de la muestra para el análisis, según protocolos internos (temperatura, integridad del envase, cantidad de muestra, etc.).

i) Independiente de los registros del laboratorio, se recomienda llevar un registro interno que dé cuenta de la cantidad de muestras entregadas, los análisis solicitados, y la conformidad de recepción de las muestras por parte del laboratorio.

A continuación se presenta un

esquema de los pasos para una adecuada toma de muestra:

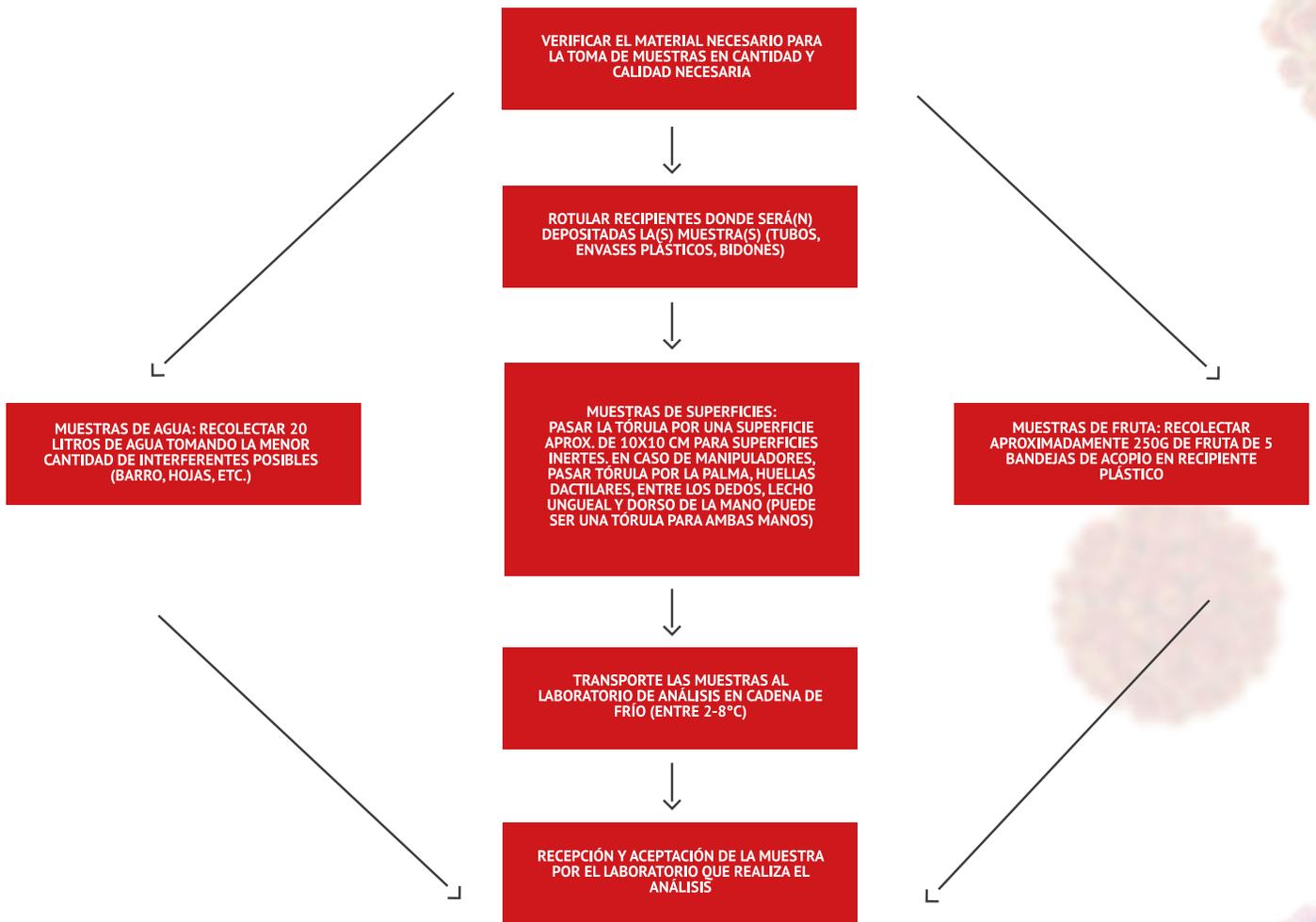


Figura 4: Diagrama de flujo para la toma de muestra (agua, fruta y superficie).

## **Procedimiento para la Conservación y Transporte de la muestra.**

-Las muestras deben ser conservadas y transportadas en condiciones que garanticen la calidad e integridad de la muestra hasta su recepción en el laboratorio. Para ello se sugiere considerar las siguientes recomendaciones:

-Transporte muestras en el contenedor isotérmico (cooler). Al momento de la toma de muestra, tenga en consideración que el cooler debe ser abierto por el mínimo tiempo necesario para almacenar cada muestra, evitando la pérdida de frío.

-Utilice gradilla para tubos o material acolchado para separar los tubos de ensayo que contienen las tómulas, impidiendo que estas puedan chocar entre sí, recuerde que eventualmente pueden transitar por caminos rurales sin asfaltar. Como recomendación, envuelva cada gradilla con tubos con papel plástico adherente, con esto evitará que los tubos se salgan de la gradilla o que las tapas se salgan de los tubos debido a la vibración producida por el movimiento del vehículo.

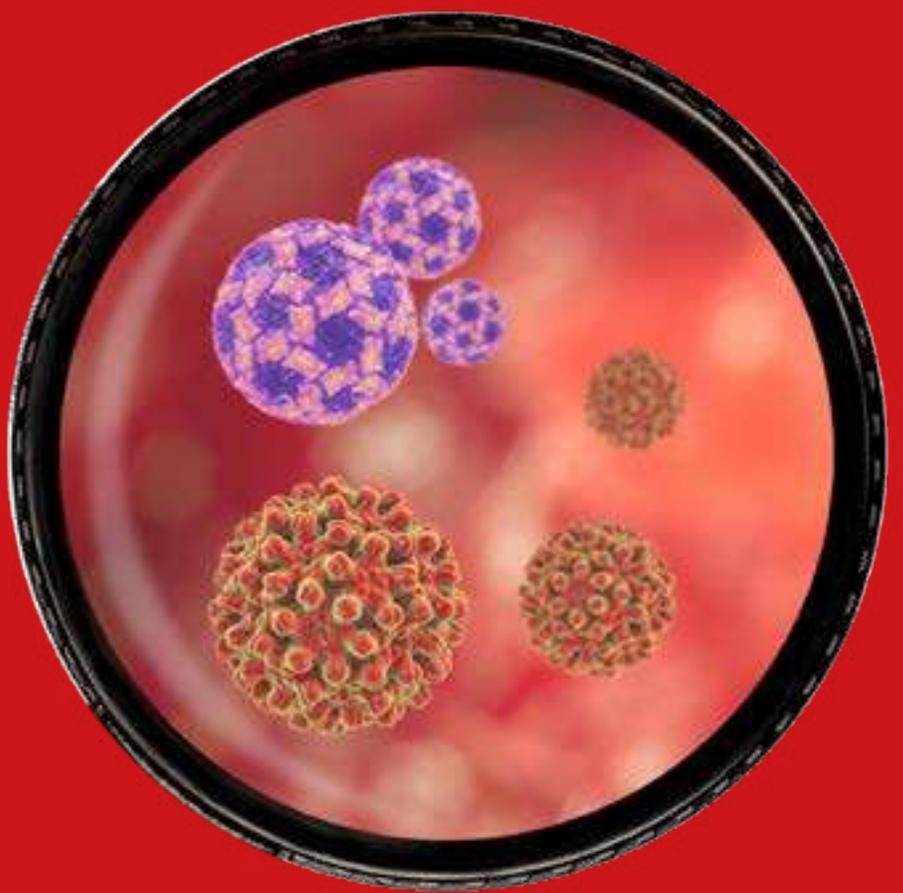
-No apile más de 3 o 4 contenedores plásticos con fruta, ya que el peso podría dañar las cajas inferiores, disminuyendo la calidad de la fruta para su análisis y perdiendo la esterilidad.

-Asegure la carga en el vehículo al transportarla, evitará que se deterioren las muestras.

-Las muestras deberán ser entregadas lo antes posible al laboratorio con el fin de no alterar el número de microorganismos presentes en la muestra, se recomienda que el tiempo entre la toma de muestra y la ejecución del análisis sea menor a 20 horas (para presencia/ausencia), este tiempo entre la toma de muestra y el análisis es menor en el caso de recuento de microorganismos. No obstante lo anterior, el tiempo entre la toma de muestra y el análisis de la misma lo definirá el laboratorio en función del análisis a realizar, ya que cada Norma y protocolo asociado establece el plazo límite a cumplir.

-Las muestras deberán ser recepcionadas por el laboratorio a una temperatura entre 2 a 8°C, poniendo especial énfasis en las muestras destinadas a análisis microbiológicos (bacteriológicos) a menos que por la naturaleza de la muestra no sea posible (bidones de agua). En el caso de bidones de agua, manténgalos en un lugar fresco o cubiertos por algún material que proteja del sol directo. Estas condiciones de mantención y transporte de la muestra deben ser acordadas con el laboratorio.

**PROCEDIMIENTOS  
ANALÍTICOS PARA  
DETECCIÓN DE  
NOROVIRUS, VIRUS  
HEPATITIS-A E  
INDICADORES  
MICROBIOLÓGICOS**



## PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA DETECCIÓN DE NOROVIRUS, VIRUS HEPATITIS-A E INDICADORES MICROBIOLÓGICOS

Todos los análisis para la detección de virus o marcadores microbiológicos deben ser realizados por un laboratorio que cuente con metodologías acreditadas bajo la Norma Chilena NCh-ISO 17025, (en su versión vigente) de forma de asegurar que el laboratorio desarrolle sus actividades según altos estándares de calidad, trazabilidad y confiabilidad en la entrega de resultados.

### DetECCIÓN DE INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

Para la detección de microorganismos indicadores de contaminación fecal en fruta, el laboratorio deberá tener implementado el análisis de detección de coliformes para la matriz de interés, según alguna norma validada por una agencia competente y reconocida.

Es importante que el laboratorio informe la metodología analítica a utilizar según la matriz a examinar (fruta, superficie, agua), y que ésta se ajuste a los requerimientos del Sistema de Aseguramiento de Calidad implementado y/o a las exigencias del mercado de destino.

### DetECCIÓN VIRAL DE NOROVIRUS Y HEPATITIS-A MEDIANTE REAL TIME PCR

A continuación, se describe en términos generales la detección de NoV y HAV según la Norma ISO/TS 15216-1 Microbiology of food and animal feed – Horizontal method for determination of hepatitis-A virus and Norovirus in food using real-time PCR – Part2: Method for qualitative detection, dado que fue la norma analítica utilizada en el proyecto que da origen al presente protocolo. No obstante, puede aplicarse otra metodología validada internacionalmente que se ajuste a los requerimientos de su Sistema de Aseguramiento de la Calidad y/o exigencias del mercado de destino. Sobre la base de la Norma ISO/TS 15216-1, la aplicación del protocolo de análisis debe considerar ciertos aspectos técnicos (26):

#### EXTRACCIÓN VIRAL:

Las partículas virales a detectar pueden estar presentes en la muestra en muy bajas concentraciones, además, la matriz a analizar puede tener características que la hacen compleja o difícil de trabajar. Razón por la que se necesita aplicar métodos específicos de recuperación viral según la matriz que se desea analizar, permitiendo obtener niveles de recuperación viral adecuados para los procesos siguientes.

### **Extracción de RNA:**

Es necesario extraer el RNA de la muestra con un proceso que asegure un alto rendimiento y pureza, además de disminuir los posibles interferentes para el proceso de PCR. Para ello, se utiliza un agente caotrópico, el tiocianato de guanidinio, que rompe la cápside viral y permite recuperar el material genético, el cual se adhiere a una sílice magnética para facilitar la purificación del material genómico luego de diversos lavados. Finalmente, el RNA es liberado de la sílice para su posterior uso (27).

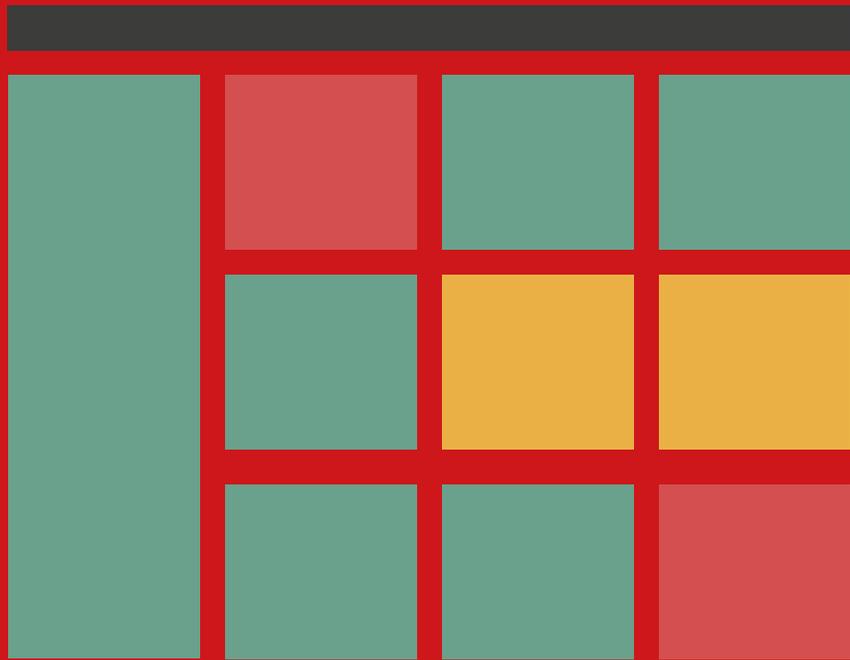
### **Real time RT-PCR:**

La transcripción reversa y PCR en tiempo real realiza en un solo paso la retro transcripción del RNA a DNA para luego llevar a cabo la amplificación del cDNA por el PCR. En este caso, para la detección de NoV y HAV, se utilizan sondas que tienen la capacidad de unirse a una secuencia específica de ácido nucleico. Estas sondas cuentan con un fluoróforo que emite una señal cuando la reacción de amplificación por PCR se realiza, lo que es detectado y cuantificado por el equipo en que se realiza el análisis. Esto permite aumentar la especificidad de la detección, e incrementa la sensibilidad de la técnica (28) (29).

### **Virus de control de proceso:**

En este tipo de ensayos, cuando el resultado es negativo, es necesario demostrar que no corresponde a un “falso negativo” dado por la pérdida del RNA viral durante el proceso. Para ello, es que la metodología de detección considera agregar artificialmente a la muestra una cantidad conocida de un virus control, inocuo y de características fisicoquímicas similares a los virus de interés, que se utiliza como control de proceso y que debemos detectar en paralelo con el análisis de Norovirus y Hepatitis-A, para comprobar que se obtuvo un nivel óptimo de recuperación viral (27). Así, un resultado negativo es válido, siempre que logremos detectar el virus control.

**I N T E R P R E T A C I Ó N  
D E R E S U L T A D O S  
A N A L Í T I C O S**



## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS ANALÍTICOS

Si bien la interpretación de los resultados puede realizarla en conjunto con algún profesional del laboratorio que realizó los análisis, a continuación, presentamos algunos criterios de interpretación que solo pretenden servir de guía para interpretar resultados de laboratorio:

**Tabla 1:** Interpretación de resultados y algunas recomendaciones, según matriz analizada.

Muestra	Coliformes fecales	Norovirus (GI/GII)	Hepatitis-A	Recomendación
Agua	-	-	-	Agua no contaminada, continúe con actividades normales y con plan de monitoreo.
	+	-	-	Agua contaminada con material fecal. Potencial presencia de NoV y HAV. Debe revisar cloración del agua, evite contacto con la fruta. Refuerce frecuencia de muestreo.
	+/-	+	-	Agua contaminada con Norovirus. Evite toda posibilidad de contacto con fruta, superficies y manipuladores. Si es posible clausure fuente de agua hasta que elimine la contaminación. Revise y refuerce acciones para el tratamiento del agua, y de aviso a autoridad sanitaria.
	+/-	+/-	+	Agua contaminada con virus Hepatitis-A, pudiendo ser positiva o negativa para NoV. Evite toda posibilidad de contacto con fruta, superficies y manipuladores. Si es posible clausure fuente de agua hasta que elimine la contaminación. Revise y refuerce acciones para el tratamiento del agua, y de aviso a autoridad sanitaria.
	+	+	+	Agua altamente contaminada. Evite contacto con fruta, superficies y manipuladores. Clausure fuente de agua hasta eliminar contaminación. Refuerce medidas de tratamiento del agua, y de aviso a autoridad sanitaria.

Muestra	Coliformes fecales	Norovirus (GI/GII)	Hepatitis-A	Recomendación
Manipulador	-	-	-	<b>Manipulador no contaminado</b> , continúe con actividades normales y con plan de monitoreo.
	+	-	-	<b>Manipulador contaminado con material fecal</b> . Potencial presencia de NoV y/o HAV. Debe revisar cumplimiento de protocolo de lavado de manos y actividades de inducción. Evite contacto con fruta y superficies hasta eliminar contaminación.
	+/-	+	-	<b>Manipulador contaminado con Norovirus</b> . Evite toda posibilidad de contacto con fruta, y superficies de contacto con la fruta. Separe al trabajador de sus labores y verifique su estado de salud. Refuerce frecuencia de muestreo en zonas expuestas.
	+/-	+/-	+	<b>Manipulador contaminado con Hepatitis-A</b> , pudiendo ser positivo o negativo para Norovirus. Evite toda posibilidad de contacto con fruta y superficies que entran de contacto con la fruta. Separe al trabajador de sus labores y verifique su estado de salud. Refuerce frecuencia de muestreo en zonas expuestas.
	+	+	+	<b>Manipulador altamente contaminado</b> . Evite toda posibilidad de contacto con fruta, y superficies de contacto con la fruta. Separe al trabajador de sus labores y verifique su estado de salud. Refuerce frecuencia de muestreo en zonas expuestas y en personas que estuvieron en contacto con el afectado.

Muestra	Coliformes fecales	Norovirus (GI/GII)	Hepatitis-A	Recomendación
Superficie	-	-	-	<b>Superficie no contaminada</b> , continúe con actividades normales y con plan de monitoreo.
	+	-	-	<b>Superficie contaminada con material fecal.</b> Potencial presencia de NoV y/o HAV. Debe revisar cumplimiento de protocolo de lavado y sanitización de superficies. Evite contacto con la fruta y manipuladores hasta eliminar contaminación.
	+/-	+	-	<b>Superficie contaminada con Norovirus.</b> Evite toda posibilidad de contacto con fruta y manipuladores. Aísle la zona y aplique protocolos de desinfección. Descarte contaminación de fruta que tuvo contacto con la superficie y revise frecuencia de muestreo y protocolo de sanitización y desinfección.
	+/-	+/-	+	<b>Superficie contaminada con virus Hepatitis-A</b> , pudiendo ser positivo o negativo para NoV. Evite toda posibilidad de contacto con fruta, y manipuladores. Aísle la zona y desinfecte. Descarte contaminación de la fruta que tuvo contacto con la superficie y revise frecuencia de muestreo y protocolo de desinfección y sanitización.
	+	+	+	<b>Superficie altamente contaminada.</b> Evite toda posibilidad de contacto con fruta, y manipuladores. Aísle la zona y desinfecte. Separe y descarte la fruta que entró en contacto con la superficie. Revise y refuerce protocolos de aseo, desinfección y sanitización, incrementando frecuencia de muestreo en zonas expuestas y personas en contacto con la superficie.

## Medidas Preventivas y Correctivas

Las medidas preventivas y correctivas deberán surgir del análisis de causa particular que se realice frente a una desviación. No obstante, algunas recomendaciones generales para prevenir episodios de contaminación por NoV y/o HAV, se listan a continuación:

"Poner énfasis en la limpieza de mesones, cintas transportadoras y cualquier superficie que entre en contacto con la fruta. Para ello, utilizar agentes eficaces de limpieza, sanitizantes y desinfectantes. Tener un implementado programa de monitoreo que permita identificar desviaciones oportunamente (18)".

"Implementar dispensadores automáticos de jabón y agua, para evitar la transmisión cruzada de virus. Utilizar toallas desechables para el secado de manos".

"Disponer de material desechable, en la medida de lo posible".

"Eliminar en forma segura el material potencialmente contaminado".

"Verificar limpieza y grado de desinfección/sanitización de superficies que entran en contacto con la fruta".

"Si un manipulador presenta síntomas de gastroenteritis, solicitar

diagnóstico médico que establezca el agente etiológico, y por precaución separarlo del contacto directo o indirecto con la fruta hasta 3 días de pasado los síntomas (17)".

"No usar aguas contaminadas".

"Realice inducción permanente de sus trabajadores, reforzando medidas de higiene y seguridad".

"Contar con un adecuado sistema de aseguramiento de la calidad".

**A N E X O S**

- Etiquete el tubo con los datos de la muestra. Eliminar medio excedente de la punta de la tórula presionando contra el costado del tubo.



- Remover la tórula del tubo.



- Arrastre la tórula por la superficie determinada (10 x 10 cm<sup>2</sup>) en dirección horizontal (de izquierda a derecha), Asegurar una fuerza razonable al pasar la tórula e ir rotándola para cubrir toda la superficie.



- Sumerja la tórula en el tubo con medio, agite suavemente y presione contra el costado del tubo para eliminar el exceso de medio.



- Ahora frote nuevamente el área de muestra con la tórula de manera vertical (de arriba a abajo).



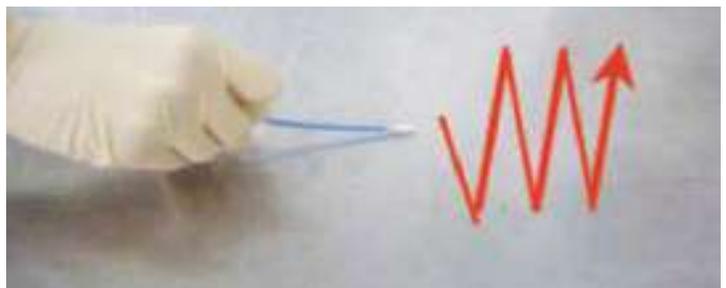
- Sumerja la tórula en el tubo con medio, agite suavemente y presione contra el costado del tubo para eliminar el exceso de medio.



- Finalmente frote la tórula en la superficie de muestra de forma diagonal.



- Coloque la tórula en el tubo y ciérrelo con la tapa rosca.



# REFERENCIAS

## BIBLIOGRAFÍA

1. Villagrán, Marcelo Muñoz. Boletín de fruta fresca (ODEPA-2017). [En línea] 29 de Noviembre de 2017. <http://www.odepa.gob.cl/boletin/boletin-de-fruta-fresca-agosto-de-2017/>.
2. Gras, Nuri. Requerimientos técnicos y desafíos para la cadena de valor de los Berries procesados según la “Food Safety Modernization Act” de EE.UU. Conferencia Internacional de Berries 2016. Talca : s.n., 2016.
3. Prato, R., Lopalco, P. L., Chironna, M., Barbuti, G., Germinario, C., & Quarto, M. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy. *BMC Infectious Diseases*. 2004. Vol. 4, 1. 37.
4. Vinjé, J., Hamidjaja, R. A., & Sobsey, M. D. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *Journal of Virological Methods*. 2004. Vol. 116, 2. 109-117.
5. Centers for disease control and prevention. Norovirus. [En línea] [Citado el: 2018 de diciembre de 22.] <https://www.cdc.gov/norovirus/>.
6. Instituto de Salud Pública de Chile. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile: Vigilancia de Norovirus. Chile, 2010 – 2012 (Vol 3, Nº6). [En línea] 2013. [Citado el: 22 de Diciembre de 2018.] <http://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADn%20Norovirus.pdf>.
7. Richards, G. P., Watson, M. A., Meade, G. K., Hovan, G. L., & Kingsley, D. H. Resilience of norovirus GII. 4 to freezing and thawing: implications for virus infectivity. *Food and Environmental Virology*. 2012. Vol. 4, 4. (192-197).
8. Organización Mundial de la Salud (OMS). Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. [En línea] 3 de Diciembre de 2015. [Citado el: 21 de Diciembre de 2018.] <https://www.who.int/es/news-room/detail/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>.
9. Cachicas V., Ramirez M., Jara M., Farias L., Morales O. , Rojas-Aedo JF., Soto M., Vega G., Gonzalez F. & Martinez MC. Detección de Genotipos de Norovirus NoV de muestras de agua asociado a gastroenteritis

de la ciudad de Ovalle, Chile 2013. Maitencillo, Chile : Congreso Chileno de Microbiología , 2013.

10. Cachicas V., et al. Detection and Characterization of Norovirus in Drinking and Reclaimed Water Implicated in a Gastroenteritis Outbreak after the Chilean Earthquake. Milwaukee, Wisconsin: International Association of Food Protection IAFP, Annual Meeting, 2011, págs. 3-64.

11. Diaz J., Solari V., Cáceres O., Mena O., Baeza S., Muñoz X., O´Ryan M., Galeno H., Maldonado A. & Mamani N. Brote de gastroenteritis aguda en la Región de Antofagasta, Chile 2010. Rev Chil Infect. 2012. Vol. 29, 1, págs. 19-25.

12. Instituto de Salud Pública de Chile. Virus Hepatitis A y E. [En línea] [Citado el: 20 de Diciembre de 2018.] <http://www.ispch.cl/virus-hepatitis-y-e>.

13. Ministerio de Salud de la República de Chile. Vigilancia Epidemiológica. [En línea] [Citado el: 21 de Diciembre de 2018.] [https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/09/5\\_VIGILANCIA-EPIDEMIOLOGICA-EN-APS.pdf](https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/09/5_VIGILANCIA-EPIDEMIOLOGICA-EN-APS.pdf).

14. Wang, X., Ren, J., Gao, Q., Hu, Z., Sun, Y., Li, X., & Rao, Z. Hepatitis A virus and the origins of picornaviruses. Nature. 517, págs. 85-88.

15. Ríos Orellana, Ivan. Informe de situación epidemiológica de hepatitis A y viral sin especificación (CIE 10: B15 y B19) Semana Epidemiológica 1— 39 (01 de enero al 29 de septiembre) Chile. [En línea] 2018. [Citado el: 20 de Diciembre de 2018.] [http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/10/BET\\_HEPATITIS\\_OCTUBRE\\_2018.pdf](http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2018/10/BET_HEPATITIS_OCTUBRE_2018.pdf).

16. Koopmans, M., & Duizer, E. Foodborne viruses: an emerging problem. International journal of food microbiology. 2004. Vol. 90, 1, págs. 23-41.

17. MacCannell, T., Umscheid, C. A., Agarwal, R. K., Lee, I., Kuntz, G., Stevenson, K. B., & Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Guideline for the prevention and control of norovirus gastroenteritis outbreaks in healthcare settings. Infection Control & Hospital Epidemiology. 2011. Vol. 32, 10, págs. 939-969.

18. Park, G. W., & Sobsey, M. D. Simultaneous comparison of murine norovirus, feline calicivirus, coliphage MS2, and GII. 4 norovirus to eva-

luate the efficacy of sodium hypochlorite against human norovirus on a fecally soiled stainless steel surface. *Foodborne pathogens and disease*. 2011. Vol. 8, 9, págs. 1005-1010.

19. Maunula, L., & von Bonsdorff, C. H. Human norovirus infection: surveillance and source tracking. *Future Virology*. 2011. Vol. 6, 4, págs. 431-438.

20. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in berries). *EFSA Journal*. 2014. Vol. 12, 6.

21. FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. Comisión del Codex Alimentarius: manual de procedimiento. 2005.

22. Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Bouwknecht, M., Rutjes, S., Willems, K., ... & D'Agostino, M. Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European countries. 4 *Food and environmental virology*. 2012. Vol. 4, págs. 179-191.

23. Maunula, L., Kaupke, A., Vasic-kova, P., Söderberg, K., Kozyra, I., Lazic, S., & Moloney, R. Tracing enteric viruses in the European berry

fruit supply chain. *International Journal of Food Microbiology*. 2013. Vol. 167, 2, págs. 177-185.

24. Kooper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W. & Gutiérrez, G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. FAO, Informe Técnico Sobre Ingeniería Agrícola y Alimentaria. [En línea] 2009. [Citado el: 20 de Diciembre de 2018.] <http://www.fao.org/docrep/pdf/011/i0480s/i0480s.pdf>.

25. Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura. Directrices para el muestreo, análisis y certificación en materia de inocuidad de fruta fresca chilena a exportar con destino a indonesia. Temporada 2018-2019. Santiago : SAG, 2018.

26. ISO/TS. 15216-1:2013 Microbiology of food and animal Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification.

27. Boom, R. C. J. A., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & Van der Noordaa, J. P. M. E. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*. 1990. Vol. 28, 3, págs. 495-503.

28. Costafreda, M. I., Bosch, A., & Pínto, R. M. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and environmental microbiology*. 2006. Vol. 72, 6, págs. 3846-3855.

29. Kageyama, T., Kojima, S., Shinohara, M., Uchida, K., Fukushi, S., Hoshino, F. B., & Katayama, K. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2003. Vol. 41, 4, págs. 1548-1557.

30- Reglamento Sanitario de los Alimentos (Dto. 37/16, Minsal D.OF. 18.01.17). República de Chile, Ministerio de Salud.

# **INSTRUCTIVO DE MONITOREO DE LA CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESAS, PARA EL CONTROL DE RIESGOS ASOCIADOS A NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A.**

**PROYECTO CORFO BP 16BPE-62273**

**VERSIÓN: N° 1**

**FECHA DE REVISIÓN: 15-03-2019**

ELABORADO POR: ALEJANDRO UNDURRAGA RODRÍGUEZ, INVESTIGADOR DE PROYECTO.

REVISADO POR: VERÓNICA GARCÍA, DIRECTOR ALTERNO DE PROYECTO.

APROBADO POR: JOSÉ PALACIOS PINO, DIRECTOR DE PROYECTO.

# A L C A N C E

Este instructivo de monitoreo y control de riesgos asociados a NoV y HAV, aplica a predios agrícolas de producción de berries y establecimientos habilitados para el procesamiento y exportación de frambuesas, arándanos, frutillas u otro tipo de berries, independiente del mercado de destino.

El alcance de este instructivo abarca etapas de cosecha y procesamiento post-cosecha, así como aquellos elementos involucrados en dichas etapas que entran en contacto directo o indirecto con la fruta y por lo tanto representan algún grado un riesgo de contaminación por NoV y HAV.

Para la correcta aplicación del instructivo, refiérase al “Protocolo de Monitoreo de la Cadena Productiva de Frambuesas, para el Control de Riesgos Asociados a Norovirus y virus Hepatitis A”.

## PUNTOS DE CONTROL Y FRECUENCIA DE MUESTREO

### 1.- Etapa de producción agrícola de frambuesas

Punto de Control	Descripción	Frecuencia de Muestro Sugerida
Aguas de uso agrícola	Independiente de la fuente del agua, es aquella que utiliza para diluir agroquímicos, lavar bandejas o cualquier otro utensilio que entra en contacto con la fruta.	Análisis de coliformes fecales: - Aguas superficiales, 5/año. - Aguas subterráneas, 5/año durante el primer año de monitoreo, y 1/año desde el segundo año en adelante. - En caso que alguna de las muestras resulte positiva para coliformes fecales, se recomienda: Mínimo un análisis de NoV y HAV.
Fruta	Frambuesa obtenida directamente desde la planta antes de ser cosechada, o bien desde bandejas de acopio una vez cosechada.	Análisis para NoV y HAV: - Mínimo una muestra representativa por temporada. La muestra deberá estar compuesta por 5 bandejas de acopio de un lote al azar de la temporada.
Manipulador	Persona que entra en contacto directo con la fruta.	Análisis de coliformes fecales: - Mínimo dos eventos de muestreo y análisis durante la temporada de cosecha (al inicio y a mitad de temporada). Si una muestra resulta positiva para coliformes fecales, se recomienda: - Mínimo un análisis viral para NoV y HAV. Las muestras podrán ser compuestas con un máximo de 3 manipuladores.
Superficies	Superficie inerte que entra en contacto con la fruta.	Análisis de coliformes fecales: - Mínimo dos eventos de muestreo y análisis durante la temporada de cosecha (al inicio y a mitad de temporada). Si una muestra resulta positiva para coliformes fecales, se recomienda: - Mínimo un análisis viral para NoV y HAV. Las muestras podrán ser compuestas con un máximo de 3 superficies.

## 2.- Etapa de producción agroindustrial:

Punto de Control	Descripción	Frecuencia de Muestro Sugerida
Agua en contacto directo o incidental con la fruta	Aquella que entra en contacto directo con la fruta, o aquella que entra en contacto con superficies que tienen contacto directo con la fruta.	Si el monitoreo microbiológico del agua está incluido en el sistema de aseguramiento de calidad de la planta, no es necesario realizar análisis adicionales. En el caso de existir resultados que sugieran contaminación por coliformes fecales aplique como mínimo un análisis de NoV y HAV.
Fruta envasada	Frambuesa que fue envasada y/o congelada	La fruta debe ser analizada para NoV y HAV, al menos una vez al mes durante el periodo de producción.
Manipulador	Persona que entra en contacto directo con la fruta.	<p>Análisis de coliformes fecales:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cada dos meses sin previo aviso.</li> </ul> <p>Si una muestra resulta positiva para coliformes fecales, se recomienda:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mínimo un análisis viral para NoV y HAV.</li> </ul>
Superficies	Superficie inerte que entra en contacto con la fruta.	<p>Análisis de coliformes fecales:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mínimo una vez al mes durante la temporada de producción.</li> </ul> <p>Si una muestra resulta positiva para coliformes fecales, se recomienda:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mínimo un análisis viral para NoV y HAV, por temporada.</li> </ul>

Tanto para la fase de producción agrícola como de procesamiento en planta, estas sugerencias de puntos de muestreo y frecuencia de muestreo quedan a criterio del encargado de aseguramiento de la calidad quien, en función del historial del grado de higiene de cada etapa del proceso, prácticas de limpieza y sanitización; ponderará el riesgo asociado y definirá el plan de muestreo en lo particular. Si se detectan desviaciones en alguno de los parámetros (NoV, HAV, Coliformes fecales), se debe aplicar un plan de muestreo que responda a la contingencia y permita evaluar la efectividad de las acciones correctivas implementadas, hasta que la desviación se dé por superada y analíticamente se demuestre que se ha reducido el riesgo de contaminación de la fruta.

## OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Independiente de las normas y protocolos que se apliquen para la selección, obtención y transporte de la muestra, se deben considerar aspectos que son transversales a ellos y que contribuyen a un adecuado proceso de muestreo. Esto es, asegurarse que se cuenta con el material mínimo necesario, y que las condiciones de obtención y transporte no afectarán la integridad de la muestra.

Recomendaciones para una adecuada obtención y transporte de la muestra:



- Verificar que dispone del material necesario para la toma de muestras en cantidad y calidad suficiente.



- Muestras de agua: Recolectar aproximadamente 20 litros tomando la menor cantidad de sólidos posibles (barro, hojas, etc.).
- Muestras de superficies: Pasar la tórula por una superficie inerte de aproximadamente 10x10 cm. En caso de manipuladores, pasar tórula por la palma, huellas dactilares, entre los dedos, lecho ungueal y dorso de la mano (puede ser una tórula para ambas manos).
- Muestras de fruta: Recolectar aproximadamente 250g de fruta, ya sea desde distintas bandejas o bien desde distintas plantas (matas).



- Transporte las muestras en cadena de frío (entre 2-8°C), y en condiciones que aseguren la integridad de estas.
- Entregue las muestras al laboratorio en el menor tiempo posible.

## **MATERIALES PARA TOMA DE MUESTRAS**

Para una correcta toma de muestras, el personal encargado debe estar debidamente entrenado y contar con el material y condiciones mínimas que exigen las Buenas Prácticas de Toma de Muestra (BPTM). A modo de referencia, a continuación, se describen los materiales mínimos necesarios para una adecuada toma de muestra:

### **Toma de muestra desde superficies:**

1. Tubos con tapa (que evite derrame), estériles.
2. Tórulas estériles.
3. Tampón fosfato-salino (sólo para detección viral).
4. Agua Peptonada Tamponada 0.1% (en caso de muestreas para Coliformes fecales)

### **Toma de muestra desde fruta**

1. Recipiente plástico rígido, con tapa, para evitar deterioro de la fruta durante el transporte.

### **Toma de muestra de agua**

1. Bidón estéril (20L), con tapa.

### **Material uso general**

1. Guantes desechables estériles (tipo quirúrgicos).
2. Etiquetas o cinta para rotular muestras.
3. Plumón indeleble.
4. Contenedor isotérmico (nevera).
5. Elementos refrigerantes para mantener el frío.
6. Elementos para proteger material de vidrio (diario, plástico acolchado, etc.)
7. Elementos de protección personal necesarios según condiciones ambientales de la zona de muestreo.

## **CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA**

- Las muestras deben ser conservadas y transportadas en condiciones que garanticen la calidad e integridad de la muestra hasta su recepción

en el laboratorio. Para ello se sugiere considerar las siguientes recomendaciones:

- Transporte muestras en frío en contenedor isotérmico.
- Utilice gradilla para tubos, o material acolchado para separar los tubos de vidrio, impidiendo que estas puedan chocar entre sí y eventualmente quebrarse.
- Al apilar contenedores de muestra de fruta, verifique que no generen daños en éstos.
- Las muestras deberán ser transportadas lo antes posible al laboratorio, para evitar alteración de resultados de análisis. Confirme con personal del laboratorio que realizará los análisis el tiempo máximo que debe transcurrir entre la toma de la muestra, y la entrega de esta al laboratorio.
- Las muestras deberán ser recepcionada por el laboratorio a una temperatura entre 2 a 8°C, poniendo especial énfasis en las muestras destinadas a análisis bacteriológicos, a menos que por la naturaleza de la muestra no sea posible (bidones de agua).
- En el caso de bidones con muestras de agua, manténgalos en un lugar fresco o cubiertos por algún material que proteja del sol directo. Estas condiciones de mantención y transporte de la muestra deben ser consensuadas con el laboratorio.





UNIVERSIDAD  
DE SANTIAGO  
DE CHILE



[WWW.CECTA.USACH.CL](http://WWW.CECTA.USACH.CL)