

**Cecta**

Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos



UNIVERSIDAD  
DE SANTIAGO  
DE CHILE

**INDAP**  
Ministerio de Agricultura

**Chilealimentos**



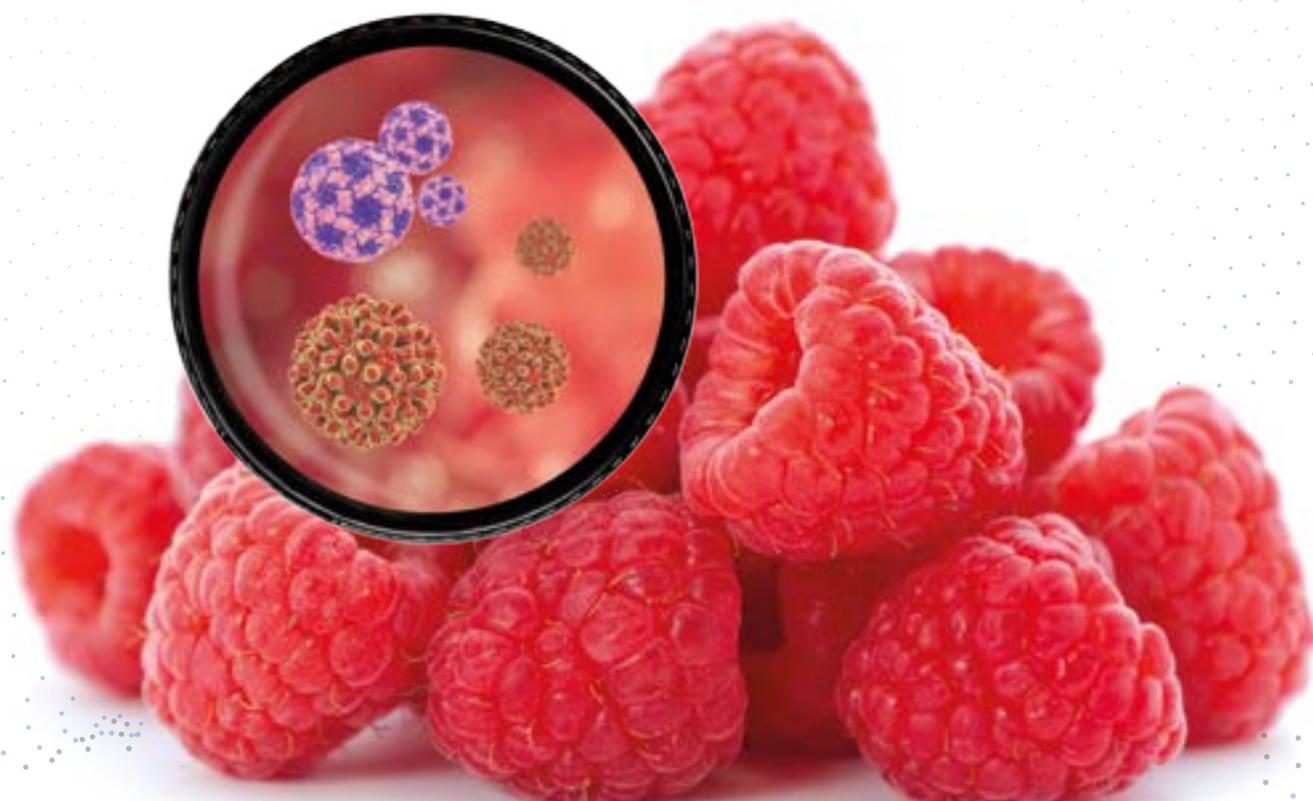
**ACHIPIA**  
Agencia Chilena para la Inocuidad  
y Calidad Alimentaria

# PROTOCOLO DE MONITOREO DE LA CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESA, PARA EL CONTROL DE RIESGOS ASOCIADOS A NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A. 2019

PROYECTO CORFO BP 16BPE-62273

VERSIÓN: N° 1

FECHA DE REVISIÓN: 15-03-2019



CeCTa

Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

# ÍNDICE

- **PRESENTACIÓN** 4-5
- **INTRODUCCIÓN** 6-7
- **ALCANCE** 8
- **OBJETIVO GENERAL** 9
- **ABREVIATURAS** 10-11
- **RELEVANCIA DE NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A EN BERRIES** 12-19
  - Norovirus
  - Hepatitis-A
  - Norovirus y Hepatitis-A en Berries
- **CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESAS: PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS Y PELIGROS DE CONTAMINACIÓN POR NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A** 20-29
  - Sector Agrícola
  - Sector Agroindustrial
- **CRITERIOS PARA EL MONITOREO DE NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A EN LA CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESAS** 30-43
  - Recomendación de puntos a muestrear y frecuencia de muestreo:

- **PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS** **44-51**
  - Materiales para toma de muestras
  - Obtención de la Muestra
  - Procedimiento para la Conservación y Transporte de la muestra
  
- **PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS PARA DETECCIÓN DE NOROVIRUS, VIRUS HEPATITIS-A E INDICADORES MICROBIOLÓGICOS** **52-55**
  - Detección de Indicadores de Contaminación Fecal
  - Detección viral de Norovirus y Hepatitis-A mediante real time PCR
  
- **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS ANALÍTICOS** **56-61**
  - Medidas Preventivas y Correctivas
  
- **ANEXOS** **62-64**
  - Procedimiento de muestreo de superficies con tórula
  
- **REFERENCIAS** **65-69**
  
- **INSTRUCTIVO DE MONITOREO DE LA CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESAS, PARA EL CONTROL DE RIESGOS ASOCIADOS A NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A.** **70-77**

# PRESENTACIÓN

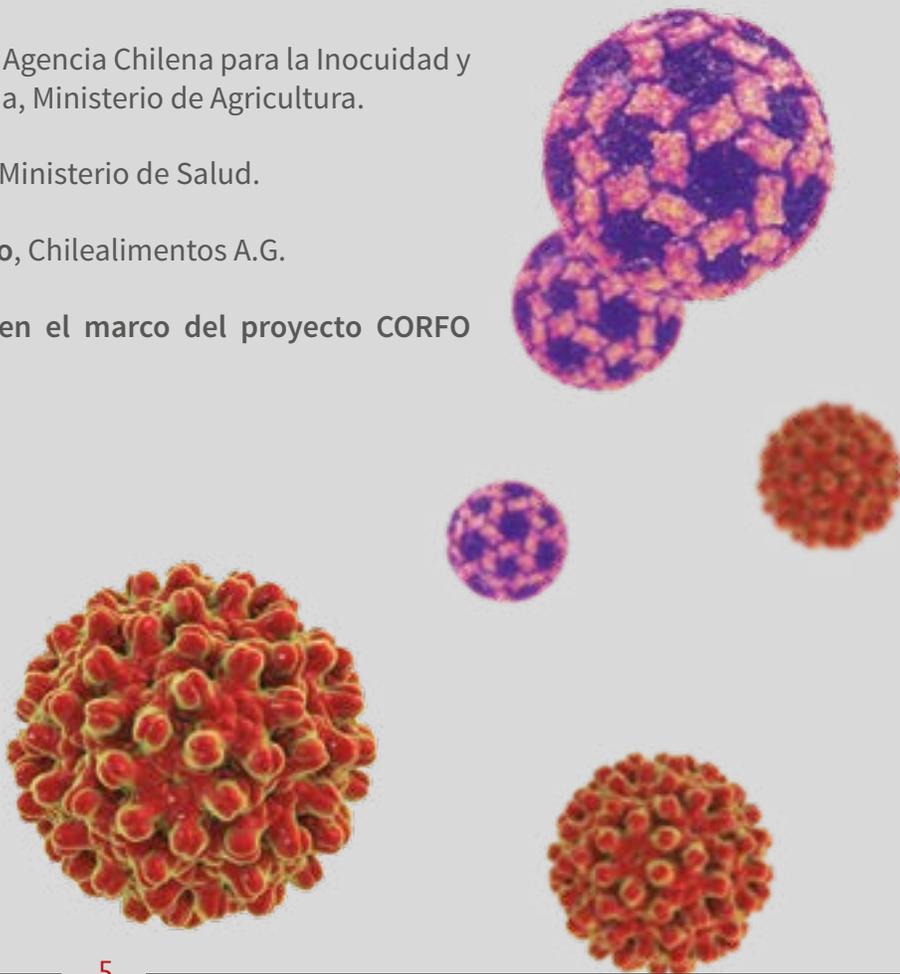
En el marco del proyecto “DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE MONITOREO Y CONTROL DE RIESGOS ASOCIADOS A NOROVIRUS Y HEPATITIS-A EN LA CADENA PRODUCTIVA DE BERRIES” (16BPE-62273), financiado por CORFO, ejecutado por la Universidad de Santiago de Chile y el Instituto de Salud Pública de Chile, y apoyado por ACHIPIA, INDAP y Chilealimentos A.G.; se generó el “Protocolo de monitoreo de la cadena productiva de frambuesas, para el control de riesgos asociados a Norovirus y Hepatitis A”. Este protocolo fue preparado por el Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CECTA) de la Universidad de Santiago de Chile, y su elaboración estuvo a cargo de:

- **Sra. Verónica García Mena (PhD)**, Investigadora CECTA, Académica DECYTAL, Universidad de Santiago de Chile
- **Sr. José Luis Palacios Pino (PhD)**, Investigador CECTA, Universidad de Santiago de Chile.
- **Sr. Alejandro Undurraga Rodríguez (BQ)**, Profesional CECTA, Universidad de Santiago de Chile.

**Especiales agradecimientos por el apoyo y valiosos aportes de los siguientes profesionales e instituciones:**

- **Sra. Viviana Cachicas**, Instituto de Salud Pública de Chile, Ministerio de Salud.
- **Sra. María Cristina Martínez**, Instituto de Salud Pública de Chile, Ministerio de Salud.
- **Sra. Marisa Lobos**, Instituto de Desarrollo Agropecuario, Ministerio de Agricultura.
- **Sra. Alejandra Aburto**, Servicio Agrícola y Ganadero, Ministerio de Agricultura.
- **Sr. Ricardo Jacob**, Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria, Ministerio de Agricultura.
- **Sr. Marcelo Ulloa**, Ministerio de Salud.
- **Sr. Andrés Acevedo**, Chilealimentos A.G.

Protocolo generado en el marco del proyecto CORFO 16BPE-62273.



# INTRODUCCIÓN

En los últimos años Chile ha logrado posicionarse como uno de los países líderes en exportación de berries, alcanzando ventas por alrededor de 860 millones de dólares anuales(1). Este alto nivel de producción y calidad de la fruta que hemos alcanzado como país, y el aumento del volumen exportado, nos exige también fortalecer aún más aquellos aspectos que impactan en la inocuidad de nuestra fruta, lo que a su vez trae consigo mayor seguridad en salud pública y un incremento del valor agregado en la producción nacional de alimentos.

Actualmente, los principales mercados de destino para los berries chilenos son EEUU, Canadá, Brasil, China, Holanda, Reino Unido, Japón, Australia, entre otros; y conforme crecen las exportaciones, y con ello el volumen de producción, toma aún más relevancia el sofisticar los sistemas de aseguramiento de calidad para disminuir el riesgo de contaminación de nuestros berries. A nivel mundial, Norovirus y virus Hepatitis-A se describen como los principales agentes causantes de ETAs, y por tanto se encuentran entre los agentes microbianos que se monitorean en este tipo de frutos, donde berries provenientes de Chile

no son la excepción. Esto último, es una situación preocupante para el mercado chileno que debemos abordar de forma preventiva pero decidida, el no hacerlo pone en riesgo la confianza e imagen de Chile en el mercado internacional de berries (2).

El mercado internacional de alimentos viene implementado normativas cada vez más exigentes en relación con la inocuidad de los alimentos, lo que exige que productores y exportadores deban adoptar sistemas que permitan asegurar la inocuidad de sus productos, identificando y controlando los riesgos de contaminación asociados a la cadena productiva. En este contexto, el sector nacional productor de berries requiere generar y adoptar sistemas que les permitan identificar y controlar sus riesgos particulares de contaminación por Norovirus y virus Hepatitis-A, y de esta forma continuar fortaleciendo el nivel de confianza que hoy el mercado internacional tiene en nuestra industria frutícola.

En este contexto, la implementación de estrategias de monitoreo y control de patógenos en la cadena

productiva de berries debe ser un compromiso transversal a todos los actores (públicos y privados) involucrados en la producción, exportación y comercialización de estos frutos. Con este claro objetivo, se plantea el diseño y aplicación de un protocolo que abarca desde el productor agrícola hasta el exportador, de forma que, desde una mirada de encadenamiento productivo, la industria productora de berries pueda implementar las medidas necesarias para asegurar la inocuidad de la fruta producida.

En respuesta a lo anterior, por medio de la ejecución de un proyecto de Bienes Públicos financiado por CORFO (16BPE- 62273), el Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Santiago de Chile y el Instituto de Salud Pública de Chile, generaron el presente protocolo que tiene por objetivo

entregar, a los actores de la cadena productiva de berries, las pautas y procedimientos para implementar una estrategia de monitoreo y control de riesgos asociados a Norovirus y virus Hepatitis-A, para ello, se identifican los puntos más vulnerables de la cadena productiva y que representan un mayor riesgo de contaminación, a fin de ser monitoreados y así fortalecer el grado de inocuidad de los berries producidos a nivel nacional.

Este protocolo, si bien está basado en el modelo de producción de frambuesa, es replicable a la producción de otros berries, razón por la que se espera que los resultados del proyecto ejecutado, impacten positivamente a todo el sector nacional productor de berries.



# A L C A N C E

Este protocolo de monitoreo y control de riesgos asociados a Norovirus y virus Hepatitis-A, 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 protocolo abarca etapas de producción y procesamiento post-cosecha, así como aquellos elementos involucrados en dichas etapas que entran en contacto directo o indirecto con la fruta, y representan en algún grado un riesgo de contaminación de ésta por Norovirus o virus Hepatitis-A. Además, se establecen ciertas recomendaciones en aspectos relacionados con la obtención de muestras, transporte de muestras,

criterios de decisión, registro y seguimiento de resultados, entre otros.

Antes de aplicar este protocolo, se recomienda sea evaluado y adaptado al contexto productivo de cada planta y predio agrícola, de forma de hacerlo compatible con el sistema de aseguramiento de calidad que se tenga implementado, complementando y fortaleciendo el monitoreo de aquellos factores y elementos que representan un riesgo para la inocuidad y calidad de la fruta.

# OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este documento es poner a disposición de la industria una guía para el monitoreo de Norovirus y virus Hepatitis-A en la cadena productiva de berries. Para ello, se entrega información que permita definir puntos de muestreo en función del riesgo de contaminación, así como enunciar recomendaciones para el control de éste riesgo en toda la cadena productiva.

El monitoreo de estos patógenos virales considera la obtención de muestras, identificación y transporte de las mismas, criterios de decisión, y recomendaciones en caso de encontrar muestras positivas para Norovirus y/o virus Hepatitis-A.



# **A B R E V I A T U R A S**

**AFC:** AGRICULTURA FAMILIAR CAMPESINA

**APT:** AGUA DE PEPTONA TAMPONADA

**BPA:** BUENAS PRÁCTICAS AGRÍCOLAS

**BPH:** BUENAS PRÁCTICAS DE HIGIENE

**BPM:** BUENAS PRÁCTICAS DE MANIPULACIÓN

**BPTM:** BUENAS PRÁCTICAS DE TOMA DE MUESTRA

**EFSA:** EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY

**ETAS:** ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

**FSMA:** FOOD SAFETY MODERNIZATION ACT

**HACCP:** HAZARD ANALYSIS AND CRITICAL CONTROL POINTS (EN ESPAÑOL SISTEMA DE ANÁLISIS DE PELIGROS Y CONTROL DE PUNTOS CRÍTICOS)

**HAV:** VIRUS HEPATITIS-A

**IQF:** INDIVIDUAL QUICK FREEZING

**ISO:** INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR  
STANDARDIZATION

**NCH:** NORMA CHILENA

**NMP:** NÚMERO MÁS PROBABLE

**NOV:** NOROVIRUS

**PCR:** POLYMERASE CHAIN REACTION (EN ESPA-  
ÑOL REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA)

**PBS:** AMORTIGUADOR FOSFATO SALINO

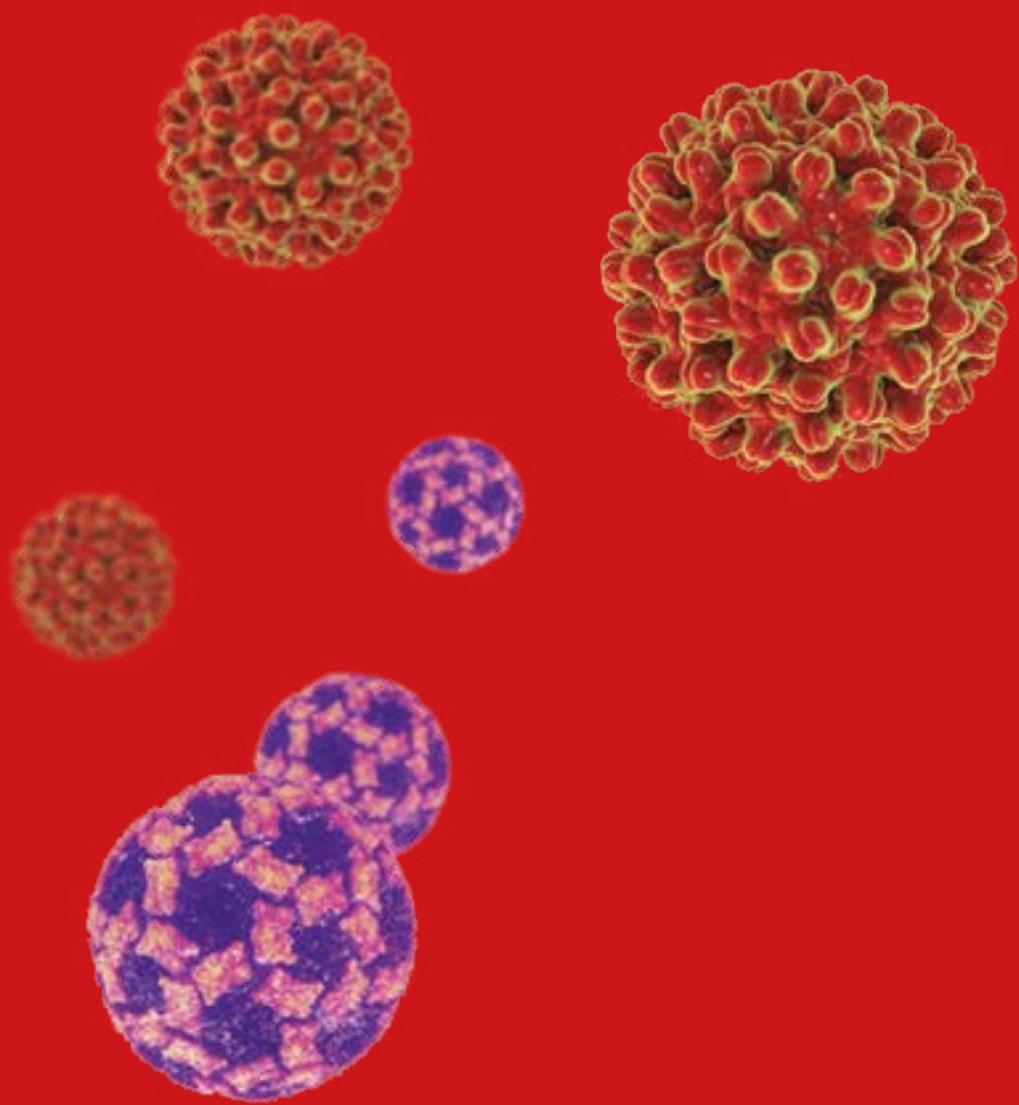
**RASFF:** RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND  
FEED

**RSA:** REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMEN-  
TOS

**SAG:** SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO

**UFC:** UNIDAD FORMADORA DE COLONIA

**R E L E V A N C I A  
D E N O R O V I R U S  
Y V I R U S  
H E P A T I T I S - A  
E N B E R R I E S**



## RELEVANCIA DE NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A EN BERRIES

Entender la relevancia de monitorear Norovirus y virus Hepatitis-A en la cadena productiva agro-industrial de berries, requiere necesariamente tener una noción de las principales características de estos patógenos virales, su acción en el ser humano, y su potencial impacto en el mercado de berries.

### Norovirus

Este virus es la causa del 90% de los casos de gastroenteritis no bacteriana en todo el mundo y del 50% de gastroenteritis por intoxicación alimentaria en EE.UU., asociándose especialmente al consumo de agua y alimentos crudos o insuficientemente cocidos (3) (4). Dado que ataca específicamente células del tracto gastrointestinal del ser humano, NoV es clasificado como un virus entérico.

Los principales síntomas de una infección por Norovirus son diarrea, vómitos, náuseas y dolor estomacal, también puede causar fiebre, dolor de cabeza y dolor corporal. El periodo de incubación suele ser entre 12 a 24 horas después de contraer el virus, y la enfermedad tiene una duración entre 1 a 3 días, generando deshidratación en niños, ancianos y personas con patologías previas, bastando solo 10 partículas virales para contraer la enfermedad; además, es relevante destacar que este virus resiste en el ambiente varios días y soporta temperaturas de hasta 60°C (5) (6), lo que dificulta su control y eliminación en la cadena productiva de fruta fresca.

Por otra parte, bajo condiciones de refrigeración y congelación, el virus permanece intacto y viable durante varios años (7).

La transmisión de Norovirus ocurre por vía fecal-oral a través del consumo de agua o alimentos contaminados, y luego del contacto con superficies contaminadas y posterior contacto con la boca, o al compartir alimentos o utensilios de comer con alguien enfermo. Partículas virales de Norovirus pueden encontrarse en heces de individuos enfermos desde los días previos a la aparición de los síntomas y hasta 2 semanas después que éstos desaparecen, caracterizándose por una rápida diseminación persona-persona en lugares cerrados como colegios, jardines infantiles, hogares de ancianos o cruceros (5).

A nivel mundial, Norovirus causa alrededor de 685 millones de casos de gastroenteritis, de los cuales 200 millones corresponden a niños menores a 5 años, lo que lleva a que 50.000 niños mueran cada año por causa de éste agente viral (5). En Estados Unidos, Norovirus causa cada año un promedio de 600 muertes (en su mayoría niños menores a 5 años y adultos mayores), 65.000 hospitalizaciones y más de 20 millones de casos de gastroenteritis, situación que hace que en Canadá y Estados Unidos la infección por Norovirus sea considerada la primera causa de ETAs; así mismo en Europa, Norovirus es considerado el principal agente responsable de ETAs con alrededor de 20 millones de casos anuales(8).



En Chile, durante el año 2010 se registró un brote de Norovirus que causó más de 30.000 casos de gastroenteritis aguda en la región de Antofagasta; luego en el año 2013 se registraron dos nuevos brotes de Norovirus, el primero en Santiago causado por agua contaminada y el segundo en Ovalle en donde 500 personas se vieron afectadas por gastroenteritis aguda asociada a Norovirus (9) (10) (11).

### Hepatitis-A



El virus Hepatitis-A es otro virus entérico que puede causar fiebre, fatiga, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, dolor abdominal, ictericia y orina oscura, llegando en algunos casos a causar la muerte debido a hepatitis fulminante. Al igual que NoV, HAV también se transmite por vía fecal-oral, siendo el ser humano el único reservorio conocido, lo que implica una importante ruta de infección también es el consumo de alimentos contaminados con el virus.



Esta ruta de infección por alimentos se favorece dada la capacidad del virus de mantenerse en el ambiente de forma latente por varios meses, hasta volver a infectar a un ser humano y multiplicarse nuevamente.

HAV tienen un periodo de incubación promedio de 28 días, mientras que los síntomas persisten por un periodo de alrededor de 2 meses. En cuanto a los individuos enfermos, el 80% de los adultos presentan síntomas mientras que los niños se mantienen asintomáticos. A nivel mundial, este

virus genera alrededor de 1.4 millones de casos anuales, y en Chile se encuentra en el programa de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Salud en la categoría de notificación diaria (12) (13) (14).

Según el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud, a la semana 39 del año 2018 se habían registrado 2.152 casos asociados a Hepatitis-A en el país, con una tasa acumulada de 11,6 casos por 100 habitantes (15). Si bien no todos los casos son atribuidos al consumo de alimentos contaminados, estos casos dan cuenta de la presencia del virus y el riesgo que representa en Chile éste patógeno viral.

### **Norovirus y Hepatitis-A en Berries**

El riesgo de infección por virus entéricos es mayor en alimentos de consumo crudo o que no son sometidos a un tratamiento térmico suficiente como para eliminar virus activos. En el caso de los NoV y HAV, los alimentos que recurrentemente son asociados a su transmisión son moluscos bivalvos (ostras, almejas, vieiras, mejillones, etc.); frutas y vegetales de consumo en crudo (lechugas, cebollas, berries, etc.); y alimentos listos para su consumo en frío (3). Estos alimentos, por ser consumidos preferentemente sin un tratamiento térmico previo, representan una potencial fuente de contagio y brotes de gastroenteritis en caso de haber sido contaminados por lavado o riego con agua contaminada, o bien por la manipulación inadecuada de un operario contagiado.

Esta situación, hace necesario que se implementen acciones que permitan

monitorear la cadena productiva de berries, en especial frambuesas y frutillas, por ser frutos que no se someten a lavado o tratamiento térmico previo a su consumo, lo que sumado a potenciales desviaciones en buenas prácticas y protocolos de higiene hacen que el riesgo de transmitir microorganismos patógenos sea mayor (5).

A diferencia de la mayoría de las bacterias transmitidas por alimentos, las cuales se multiplican por sí solas en las condiciones adecuadas de nutrientes y temperatura, los virus requieren que una cantidad mínima de partículas virales infecten a un hospedero, el cual una vez infectado generará billones de nuevas partículas virales que serán liberadas al ambiente. Esta diferencia en el mecanismo de acción, hace necesario implementar diferentes estrategias de control según se trate de bacterias o virus; así, herramientas comunes en el control de bacterias como son desinfectantes y soluciones alcohólicas al 70% tienen menor efectividad en Norovirus y Virus Hepatitis-A, sin embargo, está descrito que los tratamientos térmicos a 60 y 85°C para NoV y HAV respectivamente son suficientes para inactivarlos (16). Otra herramienta eficaz que se recomienda para el control de estos virus es una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (17), (18). Cabe destacar además, que las actuales herramientas para la detección de virus son más sensibles y costosas que las utilizadas para la detección de bacterias, lo que dificulta implementar el monitoreo constante y frecuente de estos patógenos, haciendo necesaria la asociación con un laboratorio especializado.

Las principales agencias especializadas en Europa y Estados Unidos reportan anualmente brotes y casos de fruta contaminada con NoV y HAV, dando cuenta de la constante fiscalización y preocupación que existe en estos mercados. Esta situación, hace necesario implementar medidas que garanticen la inocuidad alimentaria de los productos exportados desde nuestro país, dando muestras concretas del compromiso de la industria nacional con la calidad y la inocuidad alimentaria, lo que redundará sin duda en una mayor confianza de los mercados de destino, robusteciendo con ello al sector exportador de fruta nacional.

Como ya se ha mencionado, NoV y HAV son virus entéricos que se transmiten al ser humano por la vía fecal-oral, por lo que las principales fuentes de contaminación son superficies y, aguas contaminadas e individuos enfermos o portadores que se encuentren excretando el virus. De estos dos puntos principales deriva el resto de puntos de riesgo donde potencialmente podría ocurrir la contaminación de la fruta. A continuación se muestra un esquema que representa la ruta de transmisión de los virus entéricos.

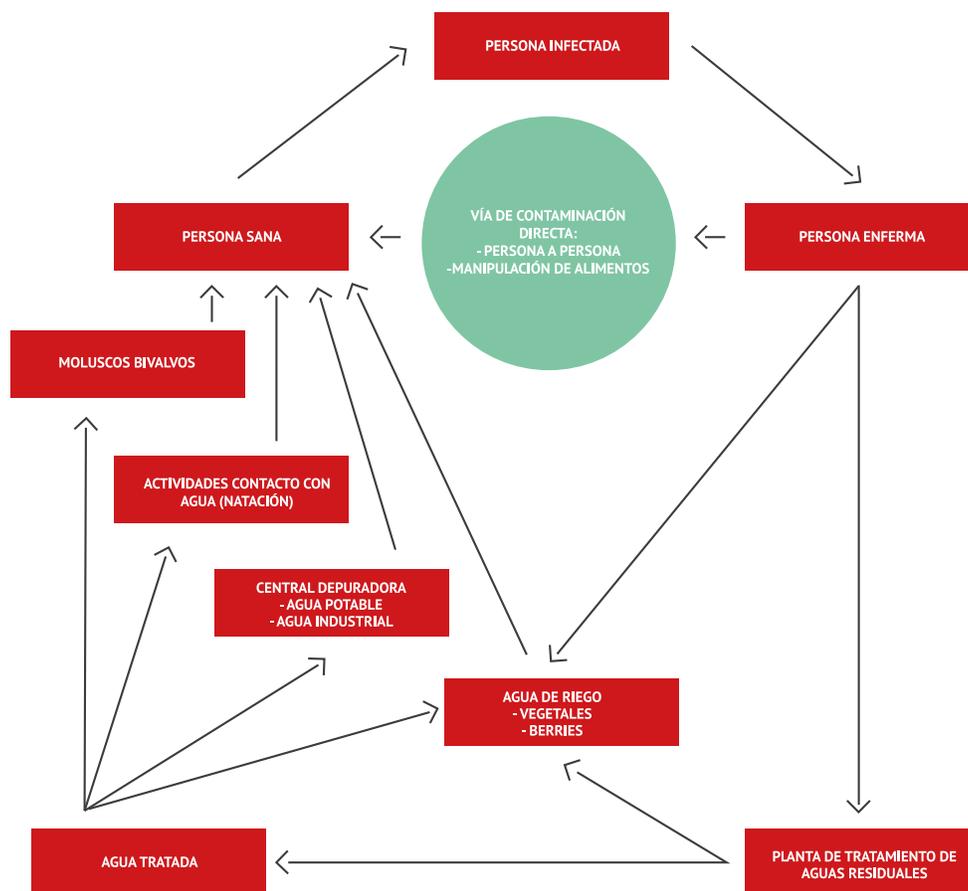
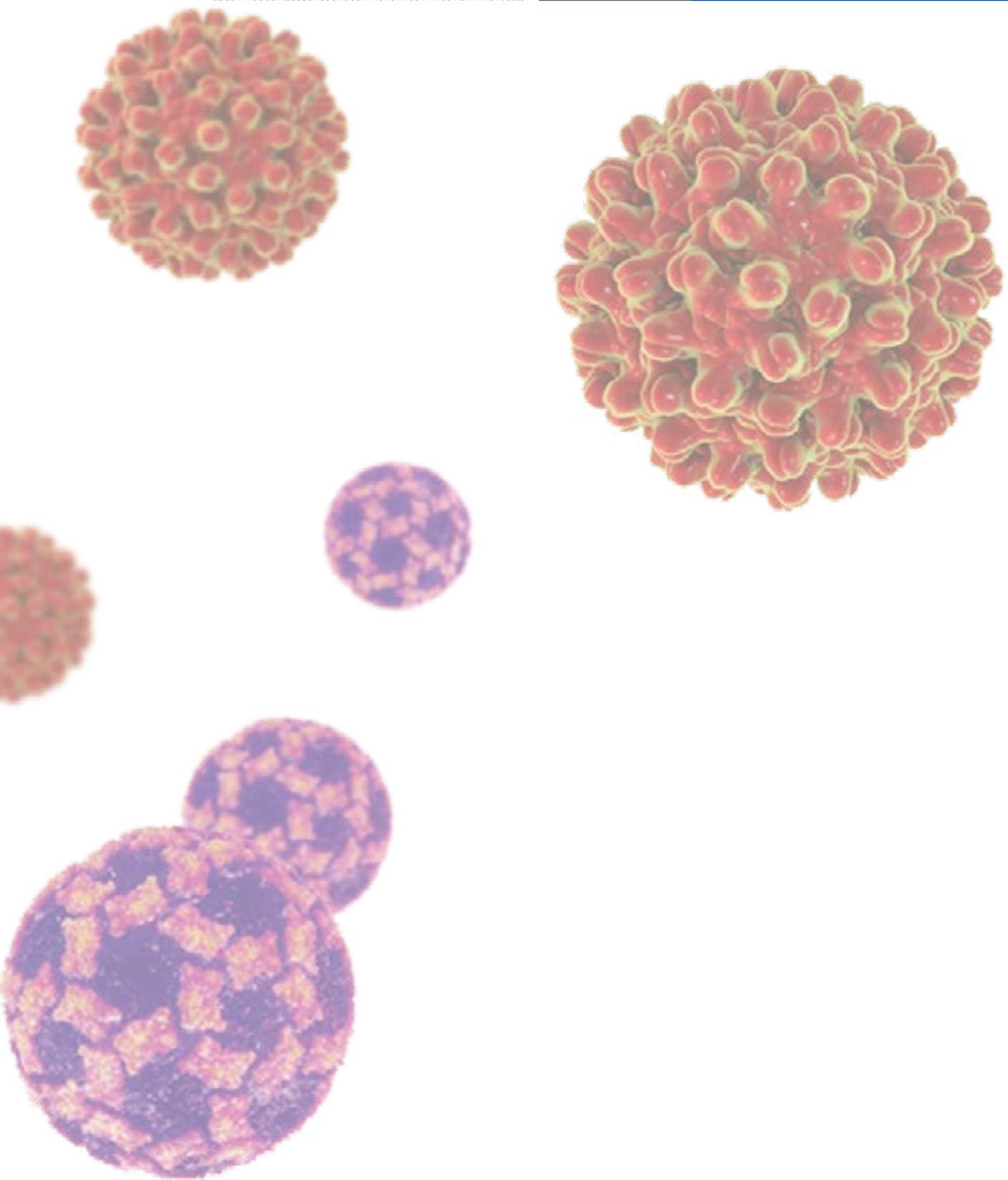


Figura 1: Rutas de diseminación de Norovirus y virus Hepatitis-A. Las personas enfermas o infectadas sin síntomas son los que comúnmente transmiten la enfermedad a través de sus propias manos, mientras que la ruta de contaminación ambiental es generada principalmente por la planta de tratamiento de agua. Esquema adaptado de Maunula y cols. (2011) (19)

A la fecha de redacción de éste documento, y sin perjuicio de lo que establece el Reglamento Sanitario de los Alimentos en su artículo 173 del Párrafo III "Consideraciones Microbiológicas por Grupo de Alimentos" (30), en Chile no existe regulación específica sobre NoV y HAV en berries, por lo que este protocolo sienta las bases que podrían orientar futuras iniciativas que se encaminen hacia un programa oficial de monitoreo preventivo, a fin de evitar eventos por berries contaminados. En Europa, las opiniones expertas de profesionales de la EFSA hacen especial énfasis en mejorar procedimientos de análisis, verificación y control, además

de perfeccionar las BPA/BPM/BPH, entre otras (20) marcando una línea de acción a la que responde el presente documento.

Este protocolo constituye el primer paso que da la institucionalidad gubernamental, la academia y la industria productora de berries, con miras de generar las herramientas necesarias para prevenir y responder frente a potenciales casos positivos para NoV y/o HAV en berries.



# **CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESAS:**

**PRINCIPALES  
CARACTERÍSTICAS  
Y PELIGROS DE  
CONTAMINACIÓN POR  
NOROVIRUS Y VIRUS  
HEPATITIS - A**



## CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESAS: PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS Y PELIGROS DE CONTAMINACIÓN POR NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A

Según el Codex Alimentarius, “peligro” es una condición intrínseca de la práctica o la situación, y “riesgo” la probabilidad que el peligro ocurra como resultado del control de condiciones y factores asociados al peligro (21). Por ejemplo, cuando un operario manipula la fruta existe el peligro intrínseco de contaminarla, no obstante, el riesgo de que la fruta se contamine disminuye al mínimo en función de que el operario cumpla las las buenas prácticas de manipulación de alimentos; en un plano más doméstico, cada vez que se manipula un instrumento cortante existe el peligro de sufrir un corte, sin embargo, el riesgo de que el corte ocurra disminuye en función del cumplimiento de las instrucciones de manipulación del instrumento y el uso de elementos de protección personal.

Como se mencionó anteriormente, aún cuando el protocolo está orientado a la producción de berries, este se centra en la cadena productiva de frambuesas de exportación como modelo de estudio, dada su representatividad de la industria de berries y la

fragilidad de la fruta en cuanto a que no es posible aplicar tratamientos posteriores a la cosecha. Al respecto, dividiremos la cadena productiva de frambuesa en dos grandes bloques, la producción agrícola en el campo y el procesamiento de la fruta en la planta procesadora de fruta congelada; si bien la venta en fresco también es un destino de nuestra frambuesa, para efectos de describir la industria exportadora, ésta última ruta comercial no será abordada.

En términos globales, la cadena productiva de la industria exportadora de frambuesa en nuestro país la componen dos macro sectores aparentemente independientes, pero muy relacionados entre sí, el sector agrícola y el sector agroindustrial. Sectores que dependen directamente el uno del otro para hacer sostenible una actividad que está sujeta a variables propias, que ponen una cuota de incertidumbre año a año a las utilidades del sector. Estas variables pueden ser independientes del actuar de exportadores y productores agrícolas, como por ejemplo las condiciones meteorológicas de cada temporada y otras relacionadas con el mercado internacional como las temporadas de producción de berries en el hemisferio norte, que puede afectar la demanda de

la frambuesa de nuestro país; sin embargo, existen otras variables que deben ser controladas por nuestro sector, como por ejemplo la inocuidad y calidad de la fruta, variables que depende tanto de quienes manipulan la fruta en el campo y en la planta procesadora, como de los responsables de generar las condiciones en infraestructura, medio ambiente y procesos para que esta manipulación se realice en las condiciones óptimas.

### **Sector Agrícola**

La producción agrícola de frambuesas en nuestro país es en el periodo de verano comprendido entre diciembre-marzo, concentrándose desde las últimas semanas de diciembre a las primeras semanas de febrero, según las condiciones climáticas de la temporada. La producción agrícola es soportada fuertemente por la Agricultura Familiar Campesina, con una importante demanda de fuerza laboral por la temporada de cosecha (temporeros), que bien pueden ser miembros de la familia del productor, o temporeros externos que rotan entre los distintos predios dependiendo de las condiciones laborales (pago y exigencias). Esta característica del sector, conlleva ciertas brechas que es necesario conocer y abordar para avanzar en el crecimiento y consolidación de

éste importante sector agrícola, como por ejemplo dificultad para alcanzar certificaciones de calidad y otros que den cuenta del cumplimiento de normativas nacionales e internacionales. En éste sentido, una producción agrícola de frambuesas basada en muchos pequeños productores, hace a su vez que exista una variedad de realidades y escenarios de producción que hace difícil una adecuada coordinación y supervisión para el cumplimiento de exigencias particulares como las BPA, BPM o BPH, y otras más transversales como por ejemplo la calidad del agua de riego y agua de “otros usos” (aplicación de agroquímicos, lavado de manos y de utensilios).

En este contexto productivo, se hace necesario generar y utilizar documentos que establezcan los conceptos y directrices que permitan, a cada productor y procesador, aplicar los mismos criterios de monitoreo y control de aquellos elementos y factores que impactan en el nivel de riesgo de contaminación de la fruta. Para ello, un aspecto relevante es identificar aquellas etapas u operaciones propias de la producción que, dadas sus características, presentan un mayor riesgo potencial de impactar directamente en la inocuidad de la fruta.

Según resultados microbiológicos obtenidos durante la ejecución del proyecto que da origen a éste protocolo, existen elementos y operaciones que representan un mayor riesgo de contaminación de la fruta por NoV y HAV, estos son:

- Agua de riego y agua para otros usos: El agua, por sus características fisicoquímicas, es un vehículo muy efectivo para una serie de contaminantes químicos y microbiológicos. En el caso del agua de riego, ésta puede proceder de distintas fuentes como por ejemplo canal de regadío, pozo zanja, pozo profundo, noria, agua potable rural, entre otros; todas fuentes que pueden verse contaminadas con materia fecal humana si no se cumple con las recomendaciones, normativas y buenas prácticas; por ejemplo, baños debidamente instalados para evitar que deposiciones lleguen a cursos de agua subterráneas o superficiales. Por otra parte, hay que cuidar que el agua utilizada en la aplicación de agroquímicos y el lavado de manos y utensilios, sea agua potabilizada.
- Manipulador o “cosechero”: Por las características de la frambuesa, ésta se cosecha a mano descubierta, lo

que hace de ésta actividad un importante factor de riesgo de contaminación. Sí el manipulador primario (cosechero) no mantiene una adecuada y permanente higiene de sus manos, y no es temporalmente separado de la labor mientras sufre o se recupera de algún cuadro diarreico o de gastroenteritis, se transforma en una fuente directa de contaminación por NoV y HAV, así como otros posibles patógenos. Además, si consideramos que éste manipulador puede trabajar en uno o más predios durante la misma temporada, se transforma en un actor clave que hay que monitorear, capacitar, y acompañar para evitar posibles focos de contaminación en la cadena productiva.

- Bandejas para cosecha y acopio: El manipulador recolecta frambuesas a manos desnudas en un pequeño canasto (por lo general adaptado para tal fin) dónde deposita las frambuesas mientras va cosechando, para luego traspasarlas a “bandejas de acopio” (entregadas generalmente por la planta procesadora) en las cuales se transporta la fruta hasta la planta. Estas bandejas, al estar en contacto directo con

la fruta, se transforman en un elemento que es necesario proteger y monitorear, ya que cualquier contaminación de éstas bandejas se traspasará directamente a la fruta, situación que obliga a aplicar medidas que mantenga estas bandejas en condiciones higiénicas y libres de contaminación.

- Baños: Los baños, más que una caseta sanitaria, son instalaciones que deben permitir a las personas satisfacer necesidades fisiológicas básicas (orinar y defecar) y un adecuado lavado de manos, en condiciones higiénicas. Para ello, se debe disponer de instalaciones limpias y desinfectadas, que cuenten con a lo menos papel higiénico, jabón y toallas desechables para secado de manos. Así mismo, estos baños deben estar instalados según la normativa, de forma que no contaminen fuentes de agua.

### **Sector Agroindustrial**

La “agroindustria” se refiere a las actividades de transformación de materias primas derivadas del sector agrícola, para generar nuevos productos con valor agregado. Para Chile, las exportaciones agroindustriales de frutos congelados representan importantes ingresos,

especialmente exportaciones de frambuesas, arándanos y frutillas. Para estas exportaciones, el SAG tiene implementado un programa (Resolución 3410/2002) destinado sólo al control de la inocuidad de las frambuesas de exportación. Cabe señalar que dado que la Resolución 3410 no es punitiva, no todos los productores están registrados en dicho programa.

Como ya se ha mencionado, la producción agrícola de frambuesa es entre los meses de diciembre y abril (aproximadamente), periodo en el cual las plantas compran toda la frambuesa que cumpla con los criterios de calidad establecidos, afanándose en congelar el producto lo antes posible.

En cuanto al proceso que se realiza en planta, y considerando el riesgo de contaminación por NoV y HAV, las actividades relevantes que se deben monitorear son:

- Recepción de la Fruta: Luego de cosechada la frambuesa se debe entregar a la planta procesadora, donde es tratada según protocolos de procesamiento y calidad de la planta, en función del destino de la fruta. En esta etapa es importante que la planta tenga registro del origen de la fruta para trazabilidad y toma de decisiones en caso

de algún brote asociado a alguna zona en particular, u otra situación relevante para la inocuidad de la fruta. En nuestra realidad productiva, el transporte y entrega de la fruta en planta puede ser realizada directamente por el productor, o bien a través de intermediarios que pueden ser formales o informales (conchenchos); estos intermediarios, si no están involucrados con la aplicación de buenas prácticas propias de la producción y el transporte de alimentos, afectan la trazabilidad de la fruta y son un potencial riesgo (no controlado) de contaminación.

- Clasificación/selección de la fruta: Es una etapa en que se elimina fruta que no cumple con criterios de calidad, donde la manipulación de la fruta representa un riesgo de contaminación directa.
- Congelación y envasado de la fruta: En la etapa de congelación la temperatura de la fruta se baja a -20°C, ya sea por medio de un proceso denominado IQF, o por medio de un proceso de congelamiento en bloque, este proceso si bien no representa una fuente de contaminación directa, es necesario monitorear que la fruta que se está

congelando cumpla con los criterios de calidad e inocuidad deseados. En cuanto al envasado, se debe garantizar la calidad e higiene de los envases utilizados.

Transversal a las etapas anteriores son los manipuladores y las superficies de contacto con la fruta dentro de la planta, los que representan un peligro de contaminación cruzada. No obstante, en plantas procesadoras con un sistema de aseguramiento de la calidad implementado el riesgo de ocurrencia disminuye con la estricta aplicación de protocolos operacionales, donde se garantice el cumplimiento de buenas prácticas como el uso de cofia, delantal y guantes desechable por parte de los manipuladores, y estrictos estándares de limpieza y sanitización. La verificación de lo anterior debe estar acompañado por un monitoreo de microorganismos indicadores de higiene y patógenos asociados, a los que se debe sumar la detección de NoV y HAV. La eventual presencia de fruta contaminada incrementa el riesgo de contaminación cruzada por estos patógenos virales.

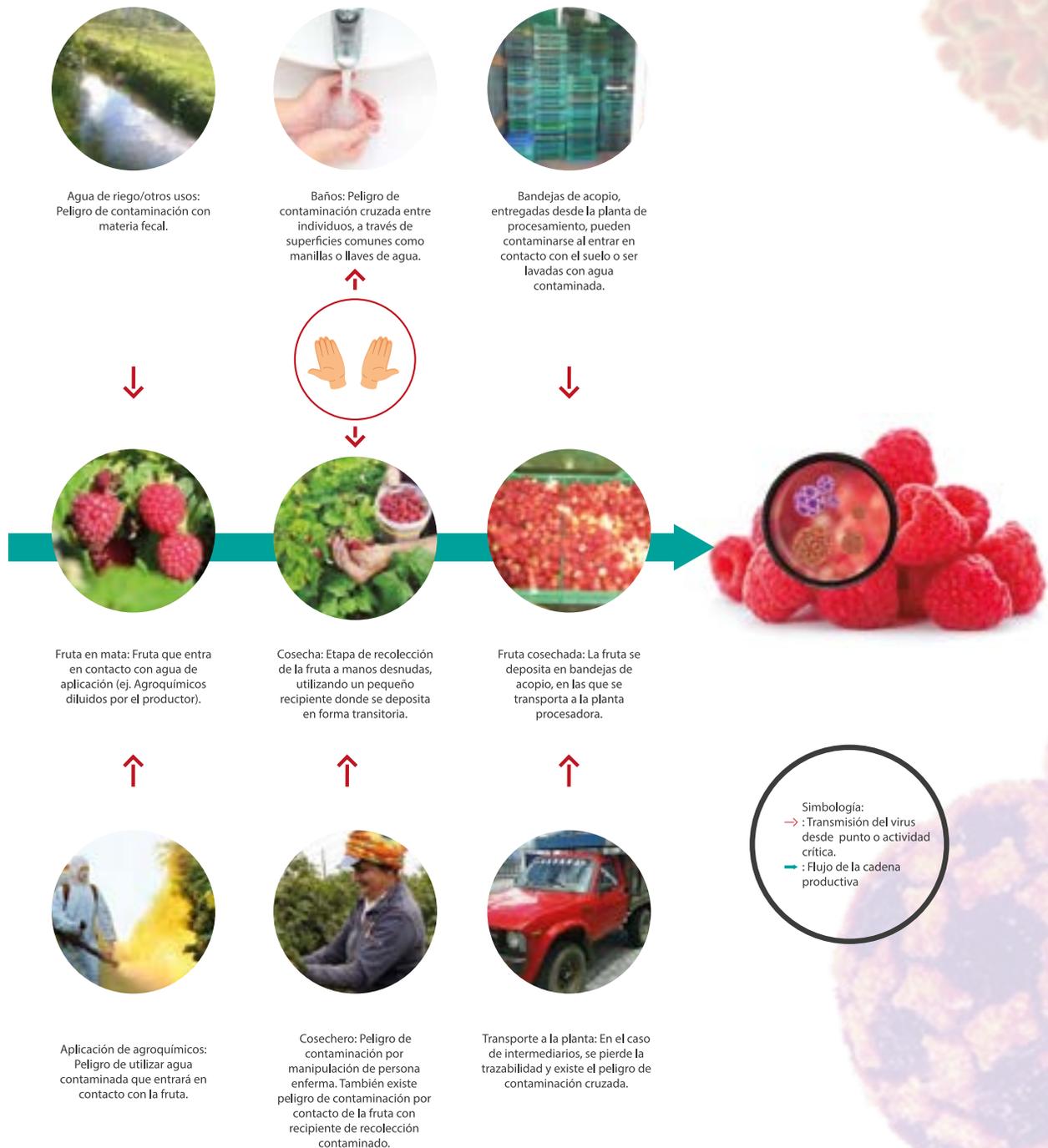
En el mismo sentido, teniendo en cuenta que NoV y HAV son virus entéricos cuya principal vía de contaminación es por el

contacto directo o indirecto de la fruta con materia fecal humana, es indispensable mantener un adecuado monitoreo del agua utilizada en la planta (lavado de instalaciones y utensilios), y de operarios que bien podrían estar enfermos o ser portadores asintomáticos.

Por otro lado, existen puntos críticos en donde el virus puede permanecer latente si no se toman las medidas necesarias; por ejemplo, un manipulador enfermo que al utilizar los servicios higiénicos puede potencialmente contaminar llaves o manillas; lo que se convierte en una posible fuente de contaminación para otro manipulador si es que no se aplican protocolos de limpieza y sanitización estrictos.

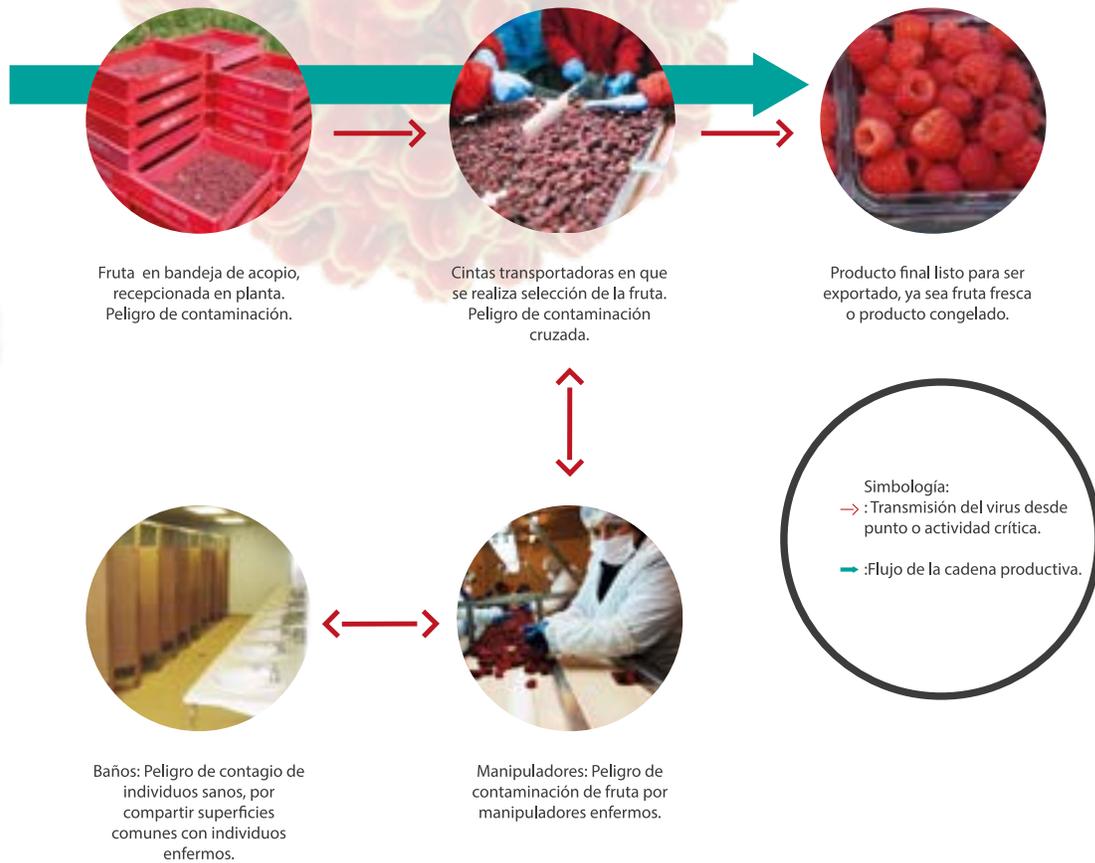
A continuación, se muestra un esquema general de la cadena productiva de frambuesas con los principales actores involucrados.

# ESQUEMA DE LA CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESA: ETAPA DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA



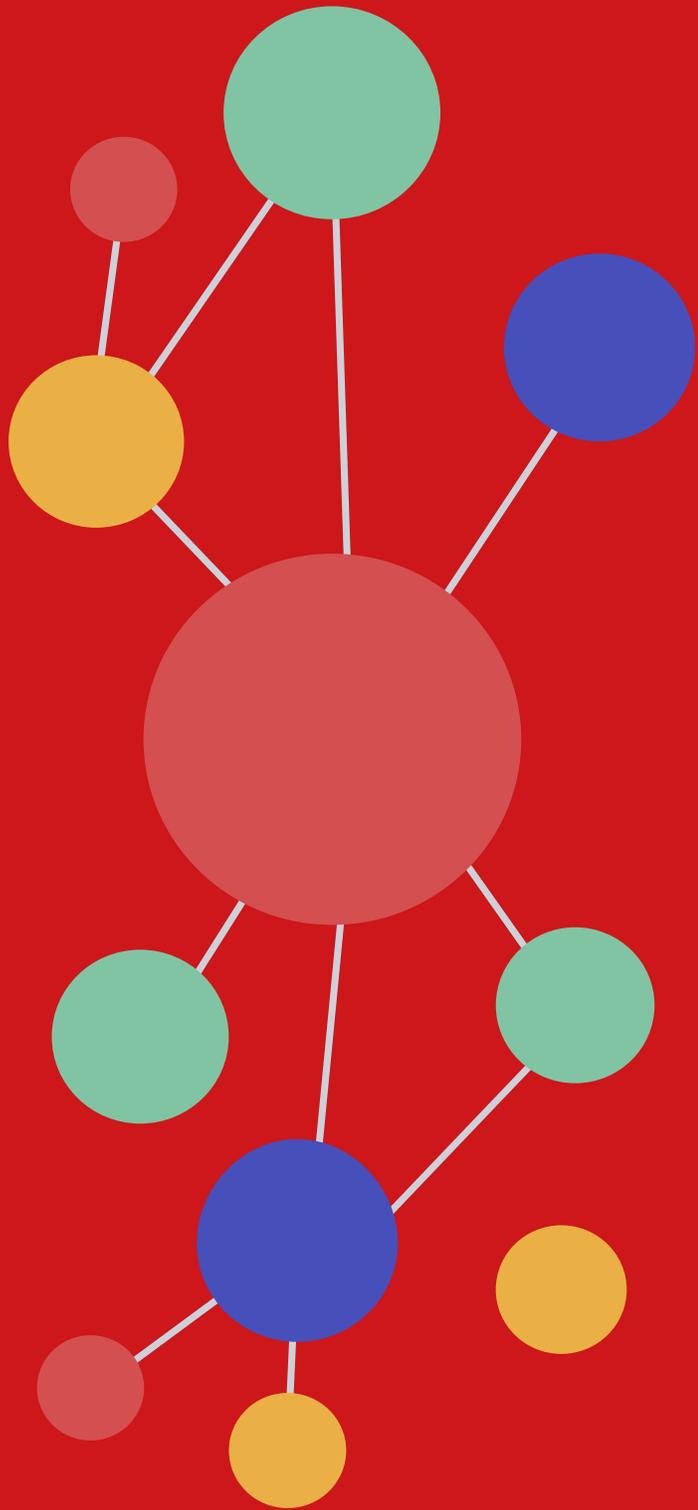
**Figura 2:** Esquema de la cadena productiva en la etapa de producción agrícola.

## ESQUEMA DE LA CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESA: PROCESAMIENTO AGROINDUSTRIAL



**Figura 3:** Esquema de la cadena productiva en la etapa de producción agroindustrial.

**C R I T E R I O S   P A R A  
E L   M O N I T O R E O   D E  
N O R O V I R U S   Y   V I R U S  
H E P A T I T I S - A   E N   L A  
C A D E N A   P R O D U C T I V A  
D E   F R A M B U E S A S**



## **CRITERIOS PARA EL MONITOREO DE NOROVIRUS Y VIRUS HEPATITIS-A EN LA CADENA PRODUCTIVA DE FRAMBUESAS**

Según la EFSA, el principal riesgo de contaminación de berries, ya sea por bacterias o virus, es el agua que entra en contacto con la fruta. La existencia de fuentes de agua y efluentes contaminados con coliformes fecales, representa un riesgo microbiológico para la producción agrícola en sí, sin embargo, el riesgo puede ser reducido identificando la fuente y determinando la calidad microbiológica del agua usada en el campo, junto con la aplicación de medidas correctivas que apunten a controlar el riesgo (20).

No obstante lo anterior, cabe destacar que, aunque el agua sea un vector relevante en la transmisión del virus, el riesgo de contaminación de la fruta puede disminuir si garantizamos que el agua de riego (potencialmente contaminada) no entrará en contacto directo con la fruta, sumando medidas preventivas como por ejemplo no cosechar fruta que esté a menos de 30 centímetros del suelo.

Por otra parte, basados en información de cuestionarios tipo HACCP, en literatura podemos encontrar la descripción de aquellos

puntos del proceso de producción de fruta que representan riesgo de contaminación por virus entéricos, entre estos puntos de riesgo o puntos críticos de control destaca, todo tipo de manipuladores que entran en contacto directo con la fruta, desde trabajadores por temporada a trabajadores permanentes, ya sea que se desempeñen en campo o en planta. Se hace una distinción entre trabajadores estacionales y trabajadores permanentes, debido a que, hasta ahora, la experiencia muestra que los primeros presentan un menor compromiso con el cumplimiento de buenas prácticas, generando así un riesgo mayor para la contaminación la fruta.

Debido a que el manipulador es el principal vector de contaminación cruzada entre distintas superficies, mantener medidas higiénicas adecuadas es la principal forma de reducir el riesgo de contaminación, especialmente de aquellas superficies inertes que se convierten en puntos de contaminación cruzada como servicios higiénicos, letrinas, manillas de puertas de baño, superficies plásticas como bandejas, envases, etc. (22) (23).

Dado que el virus se transmite a través del contacto directo o indirecto con heces de personas enfermas, se puede obtener

información relevante si se realiza un monitoreo de coliformes fecales, cuya presencia en una muestra es un claro indicador de contaminación con materia fecal (humana o animal), y por tanto una alerta respecto a un aumento en el riesgo de contaminación por NoV y/o HAV. Para monitorear coliformes fecales en la cadena productiva existen diversas normas nacionales e internacionales para la detección de coliformes fecales, ya sea en agua, superficies o fruta; las que en complementación con el monitoreo de virus entéricos generan una completa información para guiar la implementación de las medidas preventivas y correctivas, según corresponda.

### **PUNTOS DE CONTROL Y FRECUENCIA DE MUESTREO**

Definir aquellos puntos de la cadena productiva que es necesario incluir en el monitoreo de virus entéricos, requiere de un conocimiento en terreno de la cadena productiva y sus particularidades, así como los potenciales vectores de transmisión del virus que intervienen en el proceso. A pesar de que todo lo que está en contacto con la fruta es potencialmente un punto de riesgo de contaminación, los principales vectores de transmisión son el agua y los manipuladores de alimentos en la etapa de producción

(24). En el caso específico de la cadena productiva de berries existen numerosas fuentes de aguas asociada a la producción agroindustrial: agua de riego, agua de aplicación u otros usos, agua de lavado de material, agua para lavado de manos etc. En este contexto, los principales puntos a muestrear, tanto para el sector agrícola como para el sector agroindustrial, son **agua, manipuladores, fruta y superficie.**

Respecto al número de muestras y a la frecuencia de muestreo a aplicar, debe considerarse el diseño particular de cada sistema productivo y el historial de resultados microbiológicos, para en base a ello generar un plan de monitoreo adecuado a la realidad de cada productor y de cada planta procesadora, esto es: la cantidad de fruta producida y/o procesada, el número de operarios, flujo de la fruta, y otros aspectos que sean relevantes según corresponda. Para esto existen normas internacionales y normas chilenas que entregan directrices como la Norma Chilena 43 (NCh43) “Selección de muestras al azar” que permite definir criterios de aleatoriedad en la toma de muestra; Norma Chilena 1426 (NCh1426) “Frutas y hortalizas al estado natural – Muestreo”.

Sobre la base de las normas antes mencionadas se definen los siguientes conceptos:

**Lote:** cantidad definida de producto de características similares (misma variedad, mismo grado de calidad, mismo tipo de embalaje, etc.) que forma parte de la partida y sobre el cual se realiza el muestreo. Para este protocolo, cada planta definirá su lote según su propio proceso de producción; mientras en la producción agrícola definiremos “lote” a la fruta cosechada en una misma jornada, bajo condiciones que se asume son uniformes.

**Muestra de fruta:** porción de producto compuesto por fruta extraída de uno o más puntos de un lote.

### **Recomendación de puntos a muestrear y frecuencia de muestreo:**

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

Considerando la actual realidad de la AFC, el elevado costo del análisis de NoV y HAV, y que a la fecha no existe una normativa oficial; se propone monitorear NoV y HAV en los siguientes elementos y recursos de la producción agrícola:

- Aguas de uso agrícola: Definida por la FSMA como aquella que toma

contacto directo o incidental tanto con la fruta como con las superficies de contacto con el producto, deberá ser analizada para coliformes fecales 5 veces al año (FSMA) en caso de ser aguas superficiales (canal, río, etc.), y para aquellas aguas subterráneas (pozo o noria) estas deberán ser analizada 5 veces al año durante el primer año de monitoreo, y una vez al año desde el segundo año en adelante.

Según lo anterior, el agua de uso agrícola es toda aquella que se utiliza para diluir agroquímicos, lavar sus bandejas o cualquier otro utensilio que entre en contacto con la fruta. En el caso que alguna de estas muestras resulte positiva para coliformes fecales se recomienda, como mínimo, realizar un análisis de NoV y HAV.

- Fruta: Se recomienda, como mínimo, un análisis viral para NoV y HAV por temporada. La muestra podrá ser compuesta por fruta proveniente de distintas bandejas de acopio de un lote al azar, o bien según recomendaciones del laboratorio que realizará los análisis.

- Manipuladores: Realice análisis de coliformes fecales en a lo menos dos instancias durante la temporada de cosecha, al primer día de cosecha y a mitad de la temporada. En el caso

de que una muestra resulte positiva se recomienda, como mínimo, un análisis viral para NoV y HAV por temporada. Las muestras podrán ser compuestas, componiendo la muestra con un máximo de 3 cosecheros que se encuentren en el predio al momento de tomar la muestra.

- Superficies: Superficies limpias en contacto con la fruta (bandejas de acopio o cosecha). Realice dos análisis para coliformes fecales, el primer día de cosecha y a mitad de la temporada. En el caso de que una muestra resulte positiva se recomienda, como mínimo, un análisis viral para NoV y HAV por temporada. (ver anexo)

## **2.- Etapa de producción agroindustrial:**

- Agua en contacto directo o incidental con la fruta: Si el monitoreo microbiológico del agua esta incluido en el sistema de aseguramiento de calidad de la planta, no es necesario realizar análisis adicionales, a menos que, se cuente con resultados microbiológicos que sugieran contaminación del agua por coliformes fecales. En este caso realice, como mínimo, un análisis para NoV y HAV.

- Fruta envasada: La fruta debe ser analizada por NoV y HAV al menos una vez al mes, durante el periodo de producción, y siguiendo normas de muestreo que aseguren representatividad y toma de muestras al azar.

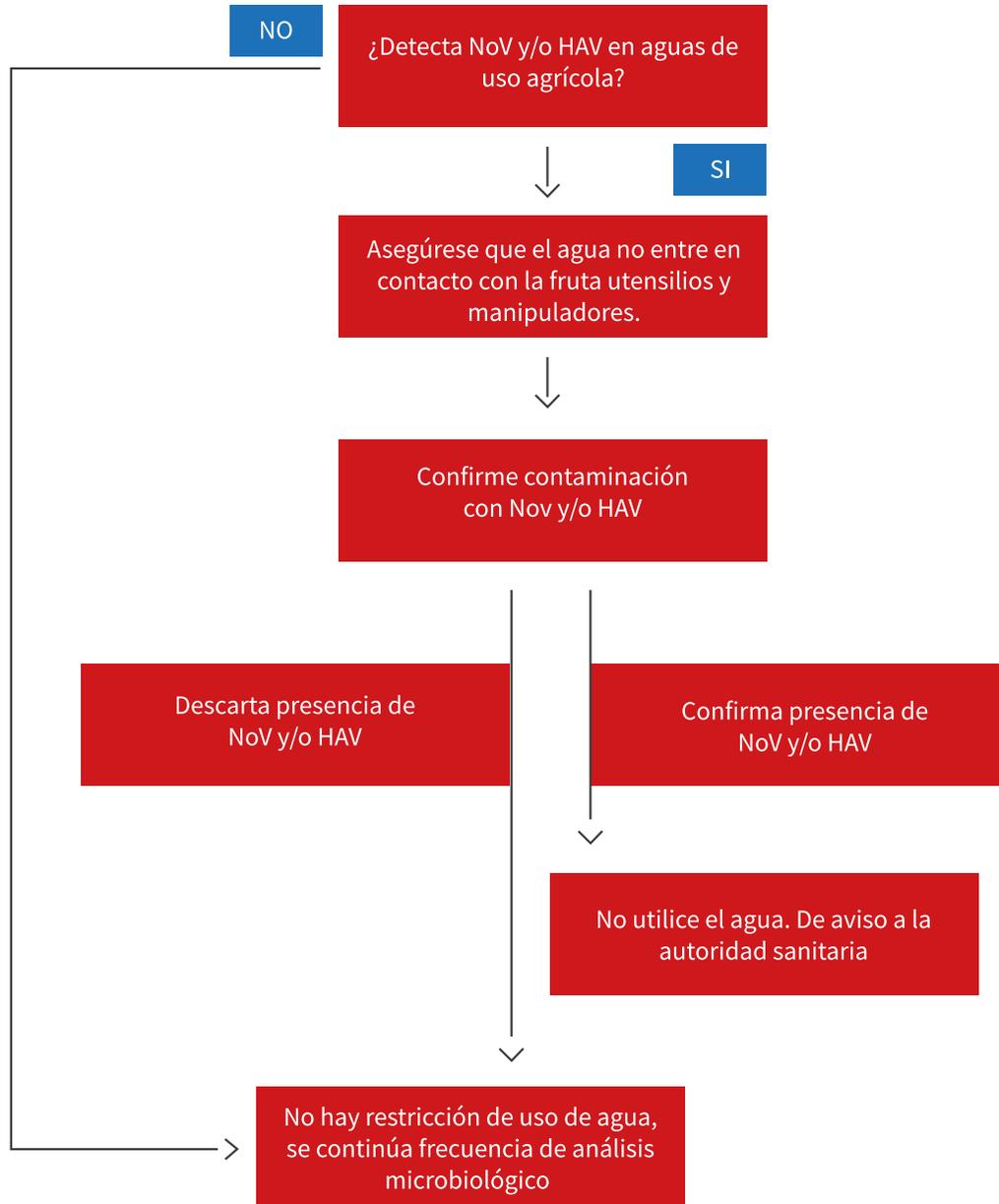
- Manipuladores: A los operarios de la planta (con o sin guantes) que entran en contacto directo o indirecto con la fruta, realice análisis para coliformes fecales cada dos meses sin previo aviso. La muestra podrá ser compuesta por hasta tres manipuladores de un mismo turno, siempre que participen simultáneamente en la misma operación del proceso productivo, de esta forma se podrá identificar la etapa del proceso involucrada en una eventual desviación. En el caso de que una muestra resulte positiva se recomienda, como mínimo, un análisis viral para NoV y HAV por temporada.

- Superficies: Superficies en contacto con la fruta (como cintas transportadoras) deberán ser analizadas para coliformes fecales una vez al mes durante el periodo de producción. En el caso de que una muestra resulte positiva se recomienda, como mínimo, un análisis viral para NoV y HAV por temporada. (ver anexo).

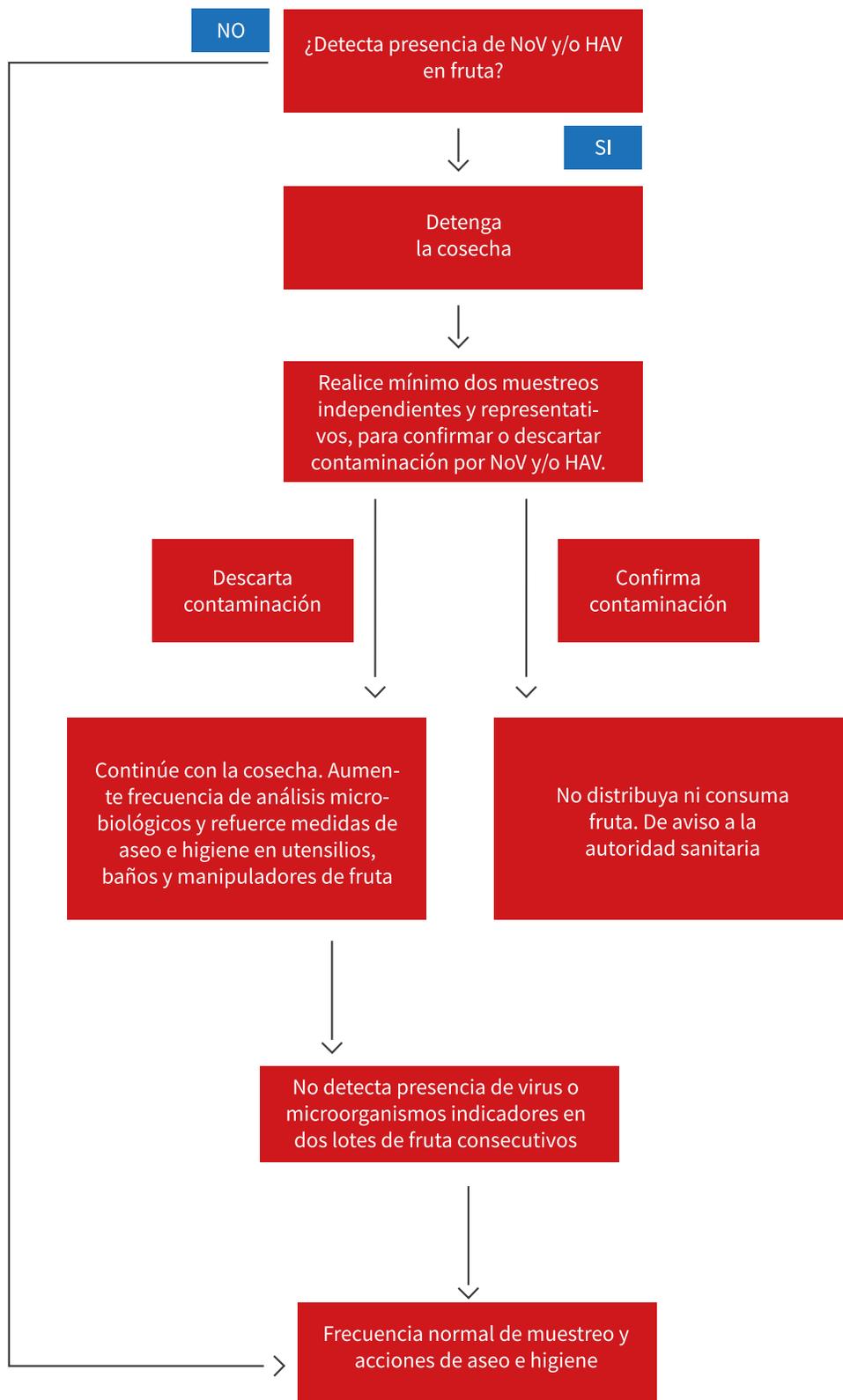
Tanto para la fase de producción agrícola como de procesamiento en planta, estas sugerencias de puntos de muestreo y frecuencia de muestreo quedan a criterio del encargado de aseguramiento de la calidad, quien en función del historial del grado de higiene de cada etapa del proceso, prácticas de limpieza y sanitización; ponderará el riesgo asociado y definirá el plan de muestreo en lo particular. Si se detectan desviaciones en alguno de los parámetros (Norovirus, virus Hepatitis-A, 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.

A continuación, se presenta un flujo de decisiones y recomendaciones que vienen a apoyar la adopción de medidas frente a la presencia de NoV y/o HAV en las etapas o elementos del proceso productivo y/o producto final.

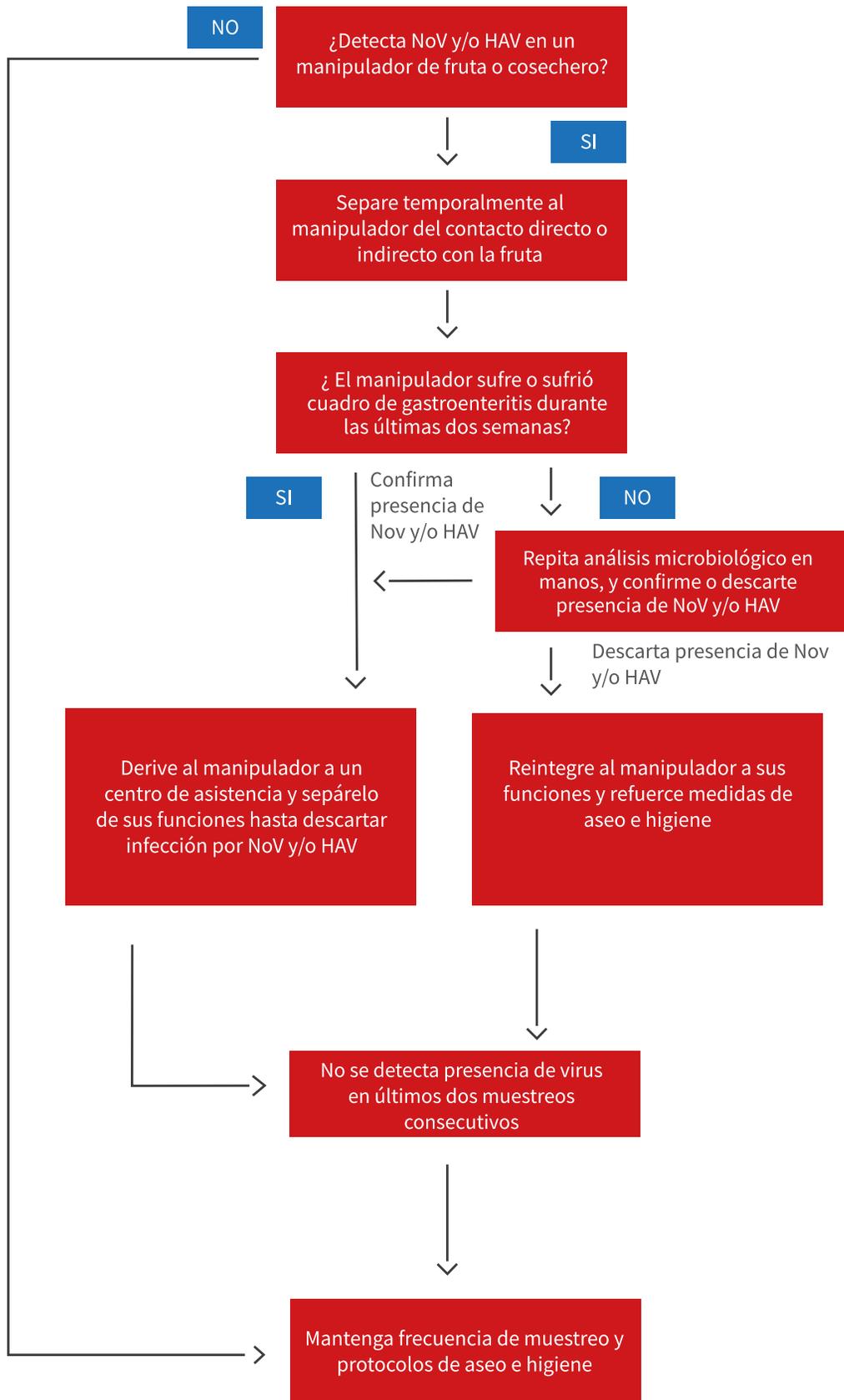
## EN EL CAMPO: AGUA



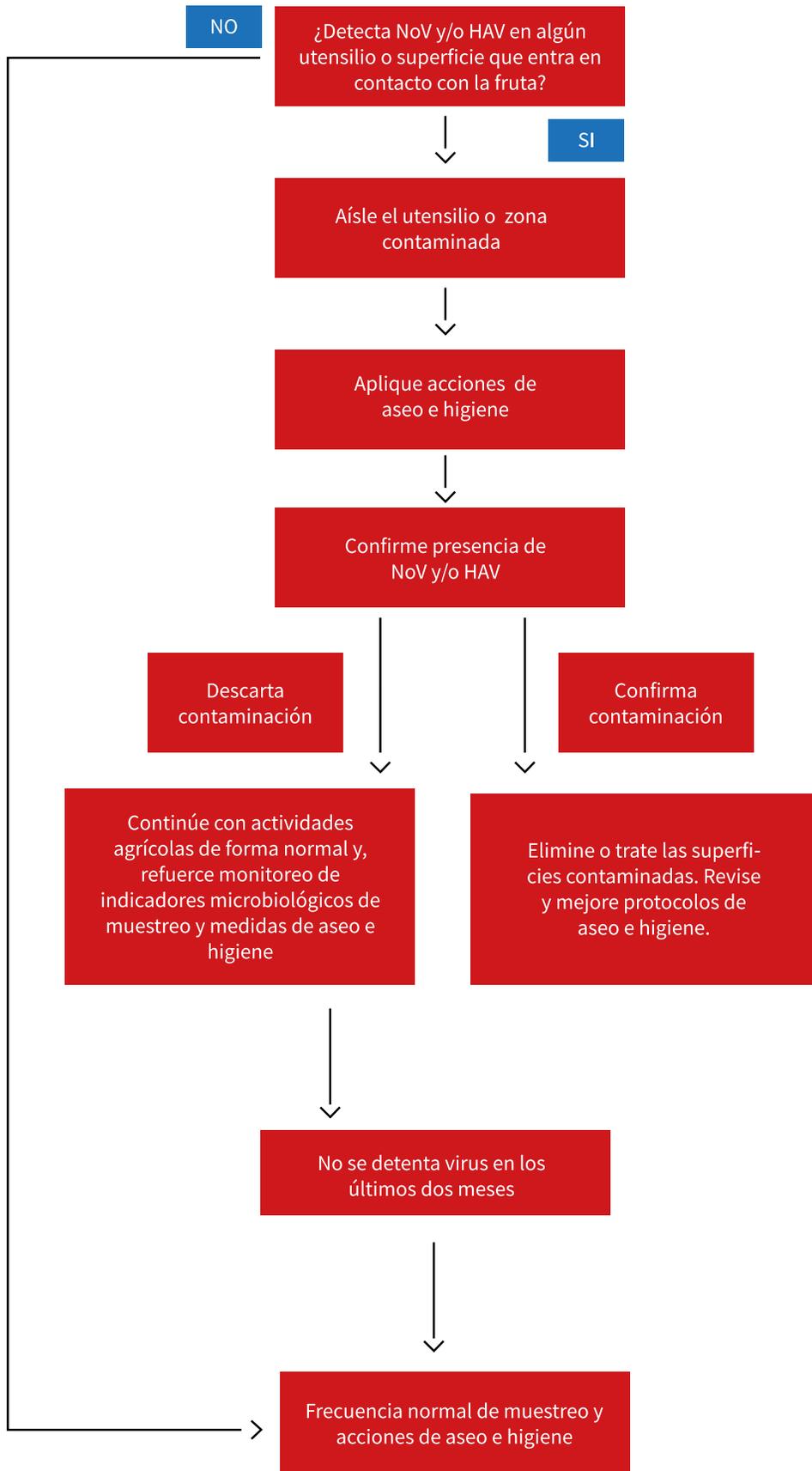
## EN CAMPO: FRUTA



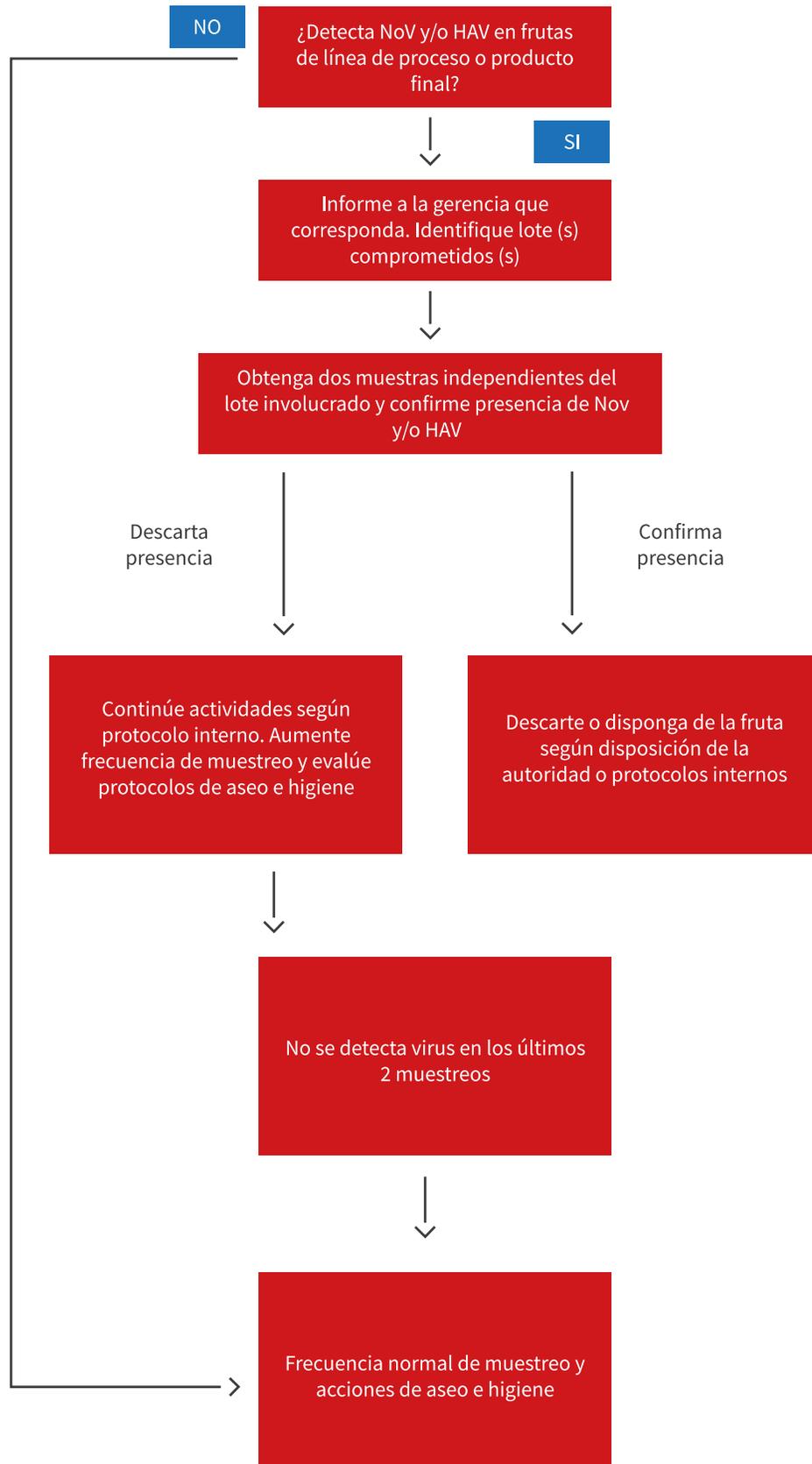
## EN CAMPO: MANIPULADOR



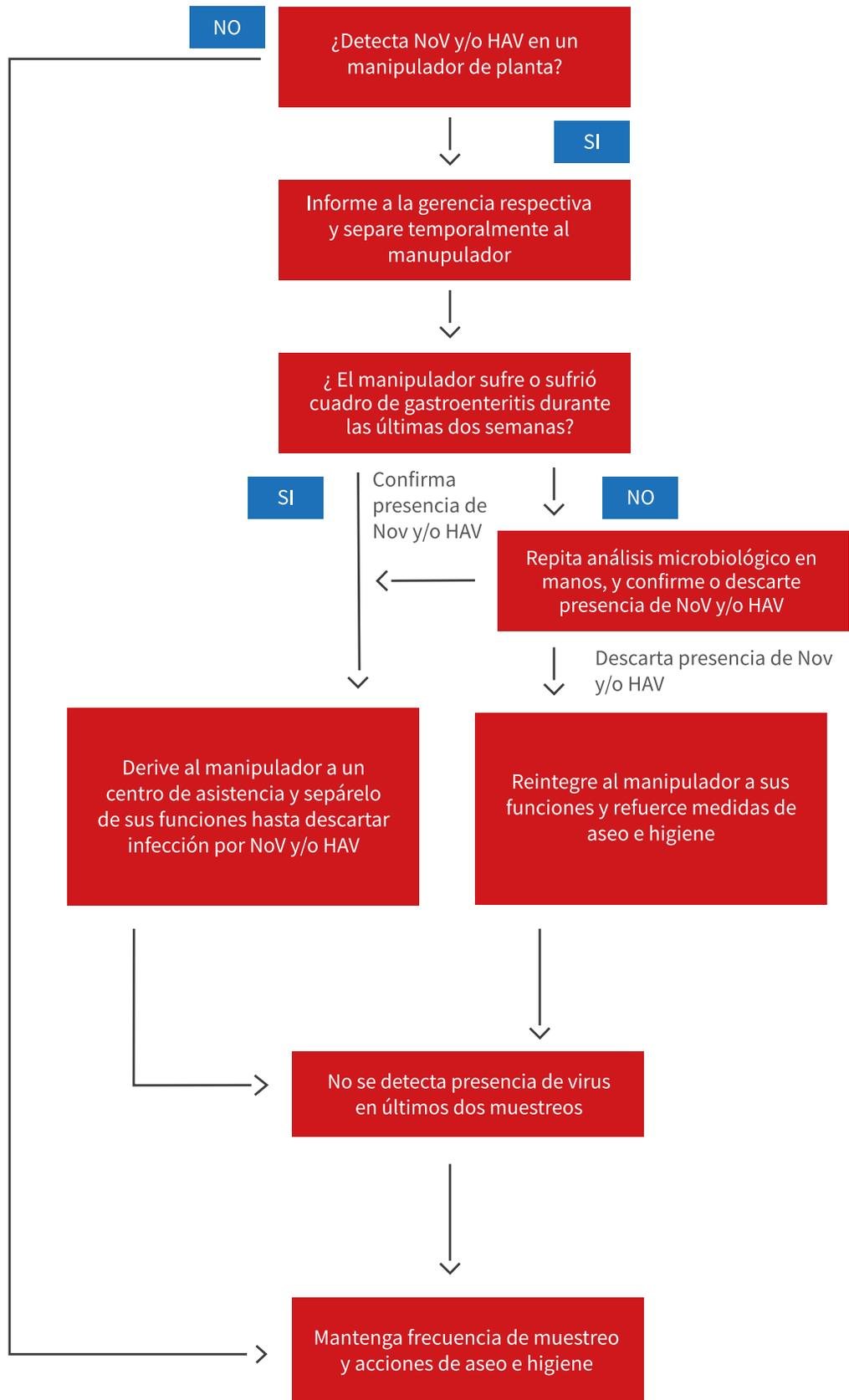
## EN CAMPO: SUPERFICIES



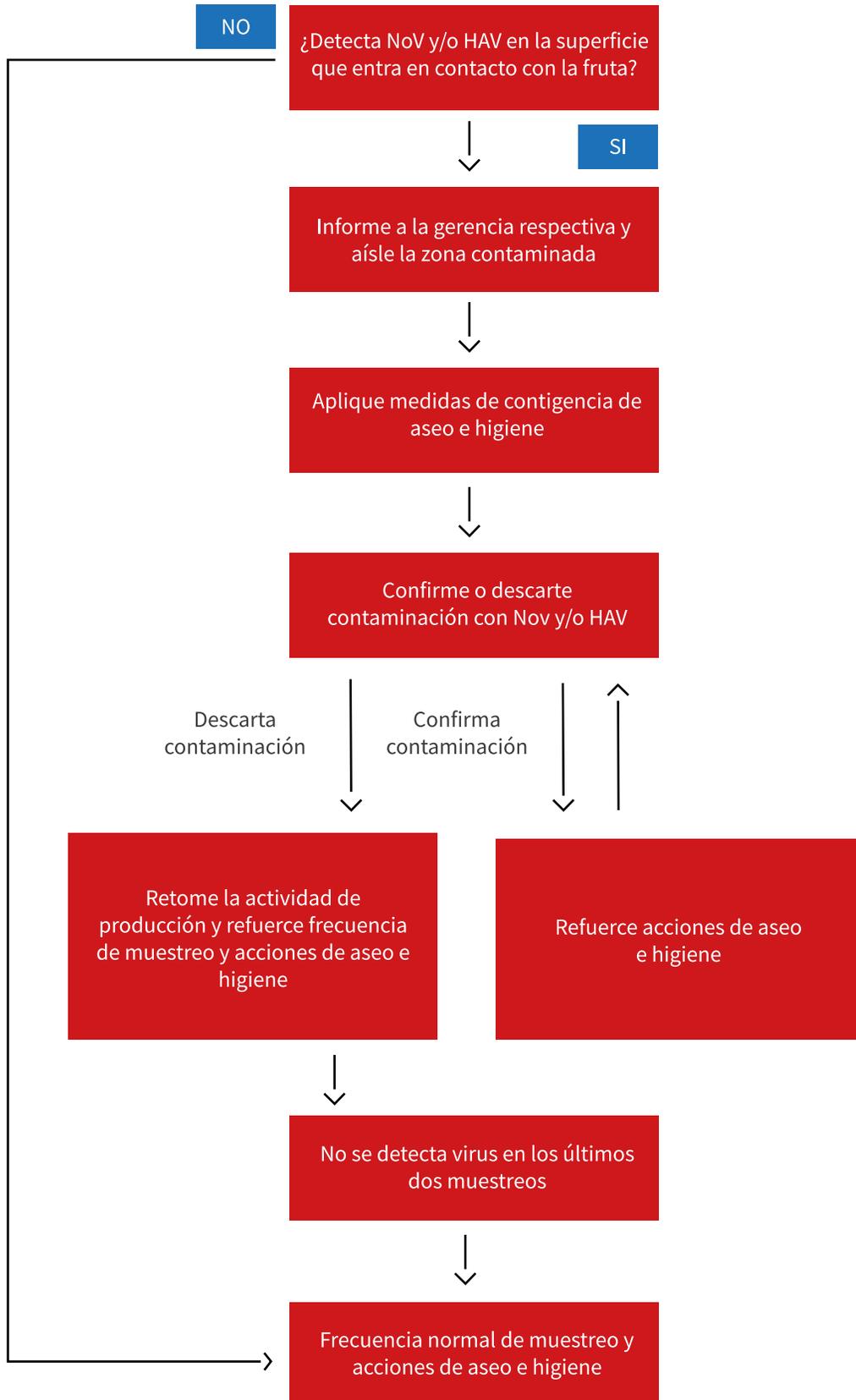
## EN PLANTA: FRUTA



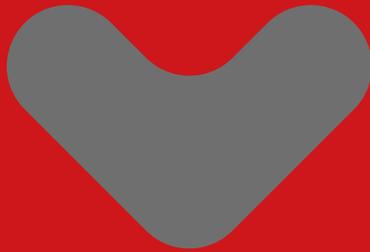
## EN PLANTA: MANIPULADOR



## 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 donde 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:

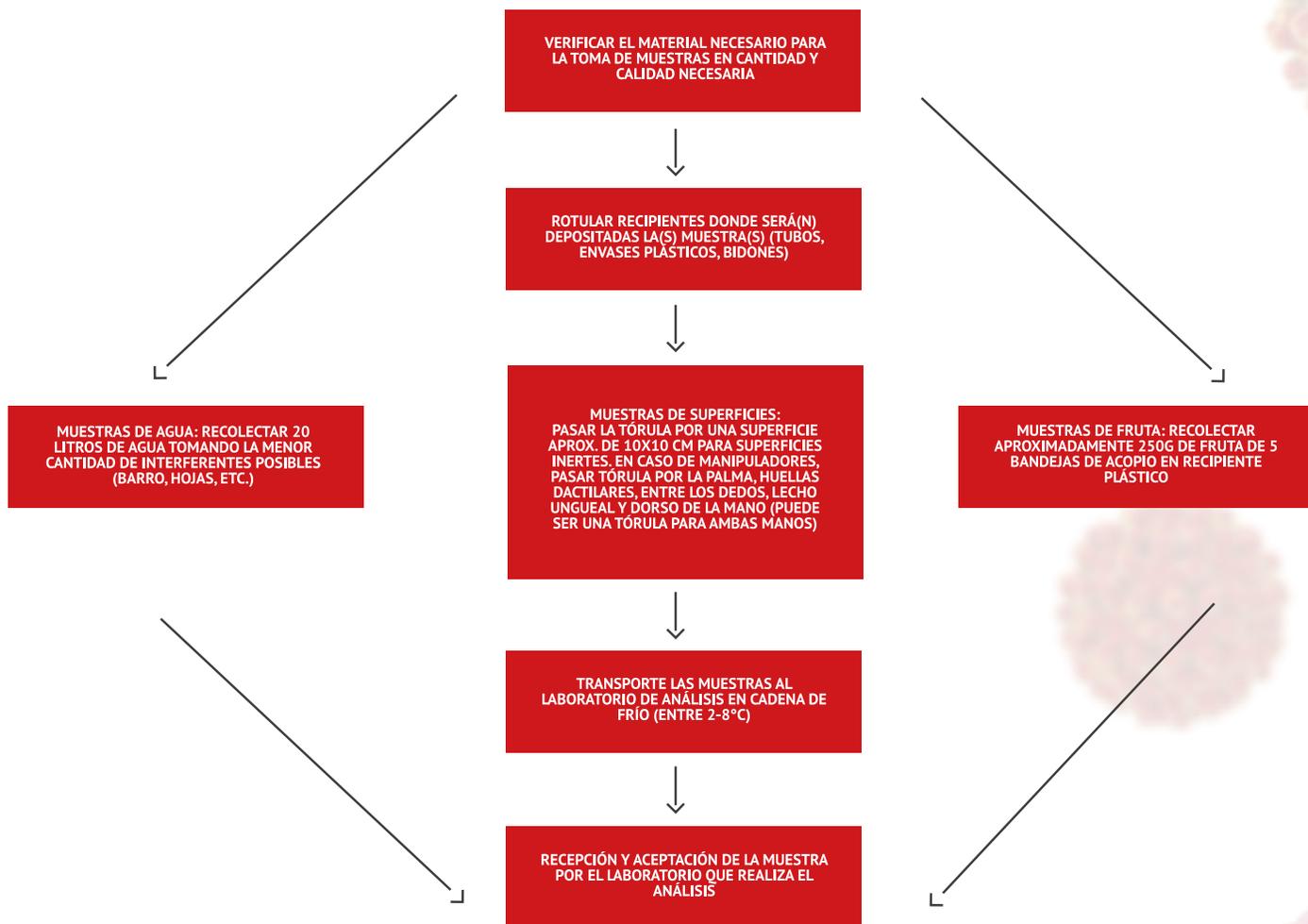


Figura 4: Diagrama de flujo para la toma de muestra (agua, fruta y superficie).

## **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.

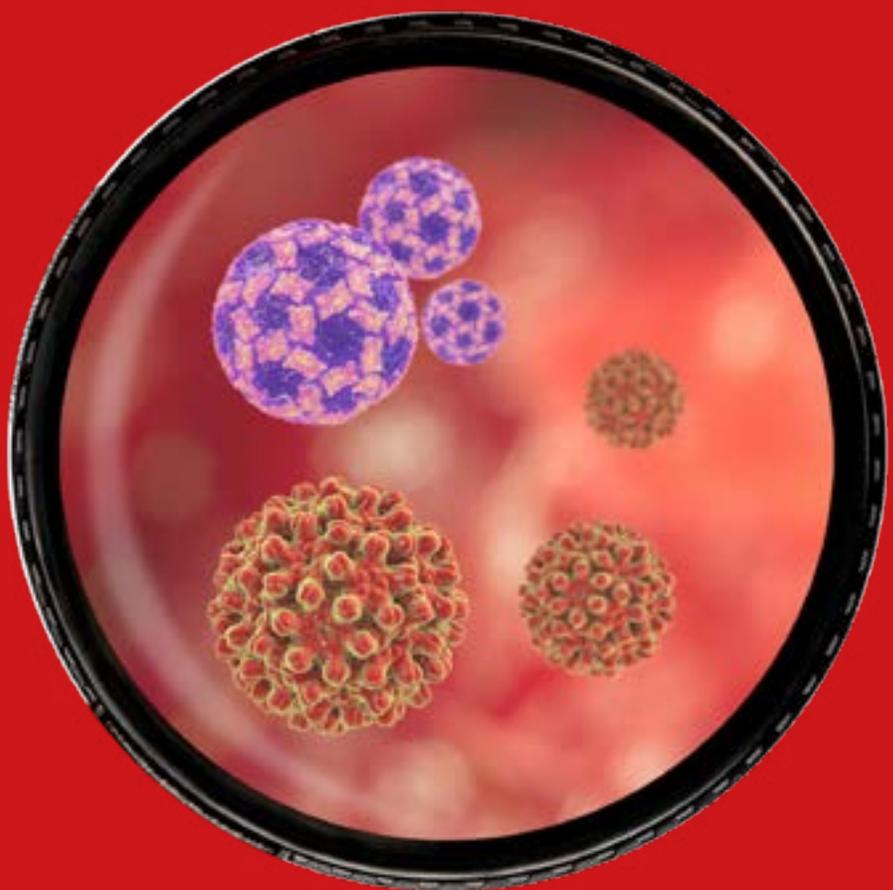
-No apile más de 3 o 4 contenedores plásticos con fruta, ya que el peso podría dañar las cajas inferiores, disminuyendo la calidad de la fruta para su análisis y perdiendo la esterilidad.

-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.

**INTERPRETACIÓN  
DE RESULTADOS  
ANALÍTICOS**



## 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**

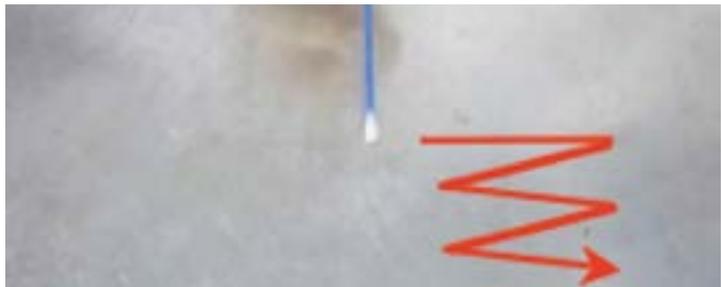
- Etiquete el tubo con los datos de la muestra. Eliminar medio excedente de la punta de la tórula presionando contra el costado del tubo.



- 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.



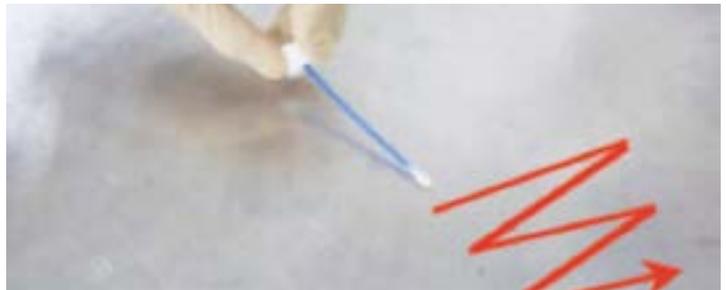
- Sumerja la tórula en el tubo con medio, agite suavemente y presione contra el costado del tubo para eliminar el exceso de medio.



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



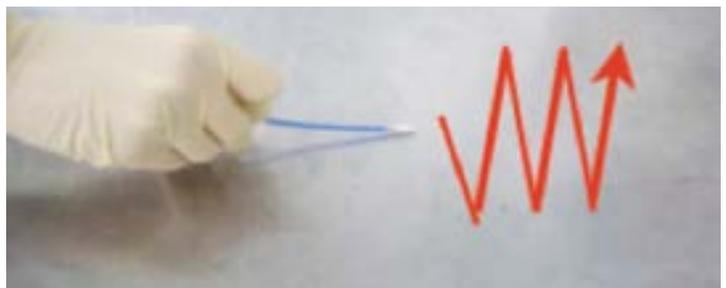
- Sumerja la tórula en el tubo con medio, agite suavemente y presione contra el costado del tubo para eliminar el exceso de medio.



- 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)