

**INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE
MICROORGANISMOS AEROBios MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA
PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12**

Código: D-ATR-AAT-14

Versión: 03

**INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE MICROORGANISMOS AEROBios MESÓFILOS
MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM®
AOAC OFFICIAL METHOD 990.12**

Tabla de Contenidos

Contenido	Página
1 Objetivos y Alcance	3
2 Referencias y Documentos Relacionados	3
3 Definiciones y Abreviaturas.....	4
4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN	4
4.1 REQUISITOS DEL PERSONAL	4
4.1.1 Responsable técnico:	4
4.1.2 Analista:.....	5
4.2 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo	5
4.2.1. Infraestructura.....	6
4.2.2. Equipos y materiales.....	6
4.2.3. Reactivos, soluciones y medios de cultivo	6
4.2.4. Estándares	7
4.3 REQUISITOS ESPECÍFICOS.....	7
4.4 MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS.....	8
4.4.1. Solicitud de autorización.....	8
5 Análisis/Ensayo	10
5.1 Captación y envío de la muestra.....	10
5.2 Recepción y manejo de la muestra.	10
5.3 Metodología	10
5.3.1 Preparación de la muestra.....	11
5.3.2 Protocolo de trabajo.	11
5.3.3 Almacenamiento de las Placas Petrifilm®.....	12
5.4. Cálculo y expresión de los resultados.....	13
5.4.1 Cálculo e informe de los recuentos en placa.....	13
6. REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS.....	14
7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	14
8 OBLIGACIONES	15
9. Formulario	15

1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de éste documento, es dar a conocer el procedimiento para que personas jurídicas accedan a la autorización y celebren convenios con el Servicio Agrícola y Ganadero, a objeto de realizar el **ANÁLISIS PARA RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12**, de conformidad con lo estipulado en el inciso tercero del artículo 1° del Decreto Ley N° 3.557 de 1980, y el Decreto Supremo N°3, de 1982, ambos del Ministerio de Agricultura.

En el presente documento, se describen los requisitos, condiciones y directrices técnicas que deben cumplir las personas jurídicas que postulen a la autorización y mantención que otorga el Servicio para la ejecución de éste análisis. Del mismo modo, se estipulan las condiciones de funcionamiento que deben cumplir una vez obtenida la autorización.

El presente documento aplica en muestras de **piel de cuello de ave**, las cuales corresponden a muestreos microbiológicos oficiales tomados desde plantas de faena para carnes de exportación, incluidas dentro del Programa de Control Microbiológico Oficial.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Resolución N° 3571 de 2021, que aprueba el Reglamento General Del Sistema Nacional De Autorización De Terceros o la que lo reemplace.
- Resolución Exenta N° 90 de 2014, del Servicio Agrícola y Ganadero. Aprueba el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo o la que lo reemplace.
- Documentos asociados al Programa de Control Microbiológico Oficial publicados en la página institucional del Servicio o emanados desde la División de Protección Pecuaria.
- Documento General "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación". SAG, versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración", versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002. Directrices para la aplicación de NCh-ISO 17025 en los laboratorios que realizan ensayos microbiológicos.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97. Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones - Parte 1: Análisis físico-químicos y microbiológicos en procesos industriales.
- ISO 11133, versión vigente "Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media" o Norma Chilena equivalente, versión vigente.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá, versión vigente.

- ISO/16140-3:2021 "Microbiology of the food chain –Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory".
- Método Oficial (OMA) AOAC 990.12: Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos en alimentos, métodos del film seco rehidratable.
- A.O.A.C. Subchapter 2: Chilled, frozen, precooked or prepared foods, and nutmeats, Microbiological Methods, Official Method 966.23 A (m).

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- Protocolo Oficial SAG: Documentos emitidos por profesionales del SAG: por ejemplo "Protocolo de Toma de Muestras y Resultados Laboratorio".
- SAG: Servicio Agrícola y Ganadero (o Servicio).
- MVO: Médico Veterinario Oficial del SAG
- INN: Instituto Nacional de Normalización.
- ISO: International Organization of Standardization.
- NCh: Norma Chilena.
- SAC: Sistema de Aseguramiento de la Calidad.
- RAM: Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos.

4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN

Las personas jurídicas interesadas en postular a la autorización en esta área, deben cumplir con todo lo establecido tanto en el Reglamento General del Sistema nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, el convenio de autorización y el presente instructivo.

4.1 REQUISITOS DEL PERSONAL

El laboratorio autorizado, deberá contar con servicios permanentes de personal capacitado y competente para realizar el **ANÁLISIS PARA RECuento DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12**.

4.1.1 Responsable técnico:

Debe contar con un responsable técnico, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado. Este cargo requiere un subrogante para períodos de ausencia del titular. Este responsable técnico y su subrogante, deben cumplir con los siguientes requerimientos:

- Poseer título profesional universitario otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera profesional del área Biológica. En caso de título obtenido en el extranjero, éste debe estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos (2) años, uno de ellos en análisis en el área de microbiología de alimentos.
- Haber recibido capacitación en la realización del **ANÁLISIS PARA RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12** en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la autorización, comprobable mediante certificado correspondiente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar, a través de la ejecución de un número de muestras positivas y negativas.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión de la calidad como en la/s metodología/s que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

4.1.2 Analista:

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

- Poseer un título profesional o técnico, de una carrera correspondiente al área biológica, o de microbiología de los alimentos, compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización, que haya sido impartida por una entidad de enseñanza superior reconocida por el Estado o, en caso de título extranjero, revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Haber recibido capacitación en la realización del **INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12** en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la autorización, comprobable mediante certificado correspondiente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar, a través de la ejecución de un número de muestras positivas y negativas.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión de la calidad como en las metodologías que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

4.2 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales, reactivos y medios de cultivo

	INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12	Código: D-ATR-AAT-14 Versión: 03
---	--	---

4.2.1. Infraestructura.

- Infraestructura y equipamiento básico requeridos para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, cumpliendo los requisitos señalados en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- El Laboratorio debe poseer infraestructura adecuada a un nivel Bioseguridad 2, de acuerdo a Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá, versión Vigente.

4.2.2. Equipos y materiales

- Stomacher.
- Bolsas plásticas resellables, estériles para stomacher y/o Bolsas con filtro de plástico resellables estériles para stomacher.
- Material estéril para contener los volúmenes de Diluyente Butterfield's Tamponado necesarios para el análisis
- Pipetas bacteriológicas estériles desechables y/o micropipetas.
- Probeta estéril.
- Tubos de ensayo estériles.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Balanza digital.
- Etiquetas (identificación de muestras) o lápiz marcador indeleble.
- Gabinete de Bioseguridad Clase II.
- Mechero.
- Vórtex o Agitador de Tubos.
- Aplicador Petrifilm®.
- Guantes desechables.
- Estufa de Incubación a 35 °C ± 1°C.
- Contador de colonias o equivalente.
- Refrigerador 5° ± 3°C.
- Congelador para mantención de cepas.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras y pinzas.
- Autoclave.

4.2.3. Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Diluyente Butterfield's Tamponado (Official Method 966.23 A (m). Ver punto 2) en cantidad necesaria para procesar las muestras y además dispensada en 9 ml en tubos de ensayo para las diluciones.
- Placas Petrifilm® 3M, para Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos dentro del período de vigencia.
- Agua Clase 4.
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1% y al 10%.

4.2.4. Estándares

Se utilizarán como estándares Cepas de colecciones reconocidas, ATCC o equivalente, una cepa de *Escherichia coli* (25922), u otra equivalente, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma ISO 11133, versión vigente. No es posible utilizar cepas bacterianas consideradas exóticas para el país. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas de colecciones de referencia serán utilizadas para el control del método de ensayo. Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse como controles positivos y negativos las cepas de referencia recomendadas por el fabricante o aquellos indicados en la ISO 11133, versión vigente.

4.3 REQUISITOS ESPECÍFICOS.

- Los laboratorios, deben contar con un sistema de aseguramiento de calidad implementado, siguiendo las directrices de la Norma ISO 17.025, versión vigente.
- El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión de la calidad que avale el cumplimiento de NCh-ISO 17025, versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos o por otra entidad Internacional acreditadora para la Norma ISO 17.025, versión vigente, reconocida por la International Organization for Standardization.
- Una vez que el laboratorio solicitante obtenga la autorización de las técnicas por el SAG, se le otorgará un plazo de 2 años para lograr la autorización de éstas ante el INN o por otra entidad Internacional acreditadora para la Norma ISO 17.025, versión vigente, reconocida por la International Organization for Standardization.
- El Laboratorio deberá indicar su capacidad diagnóstica, señalando el número de muestras que ejecuta por análisis y cantidad de analistas competentes para este alcance.
- El Laboratorio deberá presentar la documentación necesaria que avale la verificación interna efectuada para la metodología señalada en el presente instructivo. La verificación debe incluir los parámetros técnicos descritos en la norma ISO 16140-3, versión vigente.
- El Laboratorio debe contar y enviar los siguientes documentos:
 - Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la autorización.
 - Procedimiento e Instructivos de Preparación y control de Medios de Cultivo involucrados en el alcance de la autorización.
 - Procedimiento /Instructivo Preparación y Esterilización de Material de Vidrio.
 - Procedimiento /Instructivo Eliminación y Descontaminación de Residuos y Materiales.
 - Procedimiento /Instructivo Aseo y Limpieza de Laboratorios.
 - Procedimiento /Instructivo Control Biológico de Esterilidad en Autoclaves.
 - Procedimiento /Instructivo de Verificación de Equipos.
 - Procedimiento /Instructivo Control de Calidad Interno.
 - Procedimiento /Instructivo Control de Ambiente.
 - Procedimiento /Instructivo Manejo de Cepas Control.
 - Lista Maestra de Equipos e Instrumentos de Medición, reactivos, material de referencia, etc. involucrados en el alcance de la autorización, de acuerdo a lo descrito en la NCh-ISO 17025, versión vigente.

- Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Programa de Mantenimiento / Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales.
- Demostración de competencia en la metodología a autorizar para todo el personal del alcance. El informe debe incluir número de análisis positivos y negativos realizados por cada analista y Responsable técnico y su subrogante, incluyendo el proceso de confirmación.

El cumplimiento de estos requisitos será confirmado por el Servicio en la revisión documental del proceso de postulación y en la auditoría de verificación o por los medios que considere idóneos para tal efecto.

4.4 MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS.

4.4.1. Solicitud de autorización

El laboratorio postulante debe presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad implementado en el Laboratorio y que demuestre la acreditación en ISO 17025, versión vigente, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos.

Algunos de los formularios citados se encuentran en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo.

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de autorización (F-GF-CGP-PT-068), además de los antecedentes establecidos en Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG en este capítulo.

Cuando se trata de la primera autorización de laboratorios, se debe presentar el dossier legal según lo establecido en el Reglamento específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, junto con el dossier técnico. Cuando se trata de una ampliación de alcance, solo es necesario presentar el dossier técnico. En relación a este último, la documentación a presentar es la siguiente:

Dossier Técnico (obligatorio):

- Documentación indicada en el Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo.
- Documentación que demuestre la capacitación y competencia técnica del responsable técnico, su subrogante y de los analistas involucrados en la técnica del alcance de autorización, según lo descrito en el numeral 4.1 de este instructivo
- Lista Responsables Técnicos (Titular y subrogante) y de los analistas vinculados a la(s) técnica(s) del alcance de la autorización, de acuerdo al formulario F-ATR-AAT-263 de este Instructivo. El listado debe incluir a todo el personal a autorizar en el análisis/ensayo.

**INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE
MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA
PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12**

Código: D-ATR-AAT-14

Versión: 03

- Currículo del Responsable Técnico, su subrogante y de los analistas, involucrados en el alcance de autorización.
- Certificado de título del Responsable técnico, su subrogante y de los/los analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Copia del manual de aseguramiento de la calidad del laboratorio, si su sistema de aseguramiento de la calidad lo posee.
- Organigrama de personal, indicando los nombres, profesión y cargos del responsable técnico titular, su subrogante y de los analistas participantes en el análisis/ensayo autorizado.
- Copia simple del plano del laboratorio, donde se identifiquen las áreas del laboratorio y los accesos y ubicación de equipos, indicando flujo entre áreas limpias y sucias. Especial énfasis en las áreas físicas relacionadas con la autorización, incluyendo áreas de recepción de muestras, de realización de análisis, áreas de incubación, de descontaminación, bodegas de insumos y áreas de almacenamiento de medios de cultivo y materiales de referencia.
- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas (flujo de áreas limpias y sucias) y ubicación de equipos.
- Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance de autorización.
- Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención, verificación y calibración de estos.
- Lista de materiales, reactivos y Kits.
- Procedimientos y/o Instructivos específicos e informes de verificación de método y de competencia técnica del personal, señalados en los numerales 4.1 y 4.3 de este Instructivo.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, como en este Instructivo Técnico, serán confirmados por el SAG durante la visita de verificación de requisitos, a través de los medios que considere idóneos para tal efecto.

Con este fin, el SAG podrá someter al responsable técnico, su subrogante y a los analistas identificados como postulantes a la autorización, a una evaluación teórica y/o práctica, según se estime necesario.

El Dossier Técnico presentado para la postulación debe incluir toda la información solicitada en los numerales 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4 del presente Instructivo. La falta de algún documento ocasionará el rechazo de la postulación.

	INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12	Código: D-ATR-AAT-14 Versión: 03
---	--	---

5 Análisis/Ensayo

5.1 Captación y envío de la muestra

La captación de las muestras no es una actividad incluida en la competencia del laboratorio autorizado para este análisis.

Para este tipo de análisis **no se utilizarán contramuestras.**

La toma y envío de muestras, deben ser realizadas por el Médico Veterinario Oficial del SAG (MVO), el cual debe adjuntar las muestras a un Protocolo Oficial SAG, en cuyo documento debe señalar la identificación de cada una de ellas, el tipo de muestras, la fecha y la hora de la recolección de éstas y cualquier otra información que se solicite en dicho Protocolo.

Lo anterior, debe realizarse de acuerdo a lo definido en el Documento General "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación" emitido por el SAG, última versión vigente.

5.2 Recepción y manejo de la muestra.

La recepción y manejo de las muestras en el laboratorio debe realizarse de acuerdo a lo señalado en el Documento General Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación" emitido por el SAG, versión vigente u otra directriz entregada por el Nivel Central del SAG a través de vías oficiales (Circulares, Hojas de Envío, etc.). Cabe señalar, la importancia de verificar los siguientes puntos:

- ✓ Temperatura de las muestras al momento de recepción (Rango aceptado: 2° a 8 °C).
- ✓ Tiempo entre la toma de muestras (primera muestra) y la recepción en el laboratorio no superior a 30 horas, ya que deben ser procesadas a la brevedad una vez recibidas en el laboratorio.
- ✓ Integridad de las muestras y los envases que las contienen.
- ✓ Cantidad suficiente de muestra para el análisis.
- ✓ Identificación adecuada.
- ✓ Contenedor limpio con sello SAG intacto.
- ✓ Material de envase adecuado (Bolsas estériles bien selladas, frascos con cierre que impida el extravasado de líquidos etc.).
- ✓ Material refrigerante sin ruptura ni con extravasación de contenido.
- ✓ Protocolo fuera del contenedor y con los datos requeridos de acuerdo al Documento General anteriormente mencionado.

5.3 Metodología

Características del procedimiento de ensayo

Las placas de 3M Petrifilm® para el Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos están diseñadas para determinar las poblaciones totales de bacterias aerobias.

Se basa en el crecimiento de colonias de la flora aerobia mesófila que lleva la muestra. El diseño de esta placa presenta una película con nutrientes y agentes gelificantes soluble en agua y un indicador rojo de Tetrazolio para brindar un mejor contraste y facilitar el recuento.

5.3.1 Preparación de la muestra.

• Piel cuello de ave:

- Asépticamente pesar a lo menos 10 ± 0.1 g de muestra representativa (manteniendo relación 1:10 con el diluyente) dentro de una bolsa estéril Stomacher.
- Agregar 90 ml de Diluyente Butterfield's Tamponado para tener relación 1:10. Esta dilución es denominada 10^{-1} . No usar tampones que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato con las placas Petrifilm®, ya que pueden inhibir el crecimiento.
- Luego depositar 1 ml de esta dilución de acuerdo a lo descrito en punto 5.3.2.
- La siembra en duplicado queda a criterio del laboratorio, para lo cual se debe repetir el procedimiento antes descrito.
- Homogenizar la muestra en equipo Stomacher por 1 minuto a velocidad media.
- A partir de la dilución anterior tomar 1 ml y depositarlo en un tubo que contenga 9 ml de Diluyente Butterfield's Tamponado. Esta dilución es denominada 10^{-2} . Con estas 2 diluciones se continúa en el punto 5.3.2.
- En caso de ser necesario, el laboratorio puede realizar más diluciones sucesivas con el objeto de obtener placas con recuentos contables.

* **NOTA:** Cabe señalar, que una vez realizado el paso anterior, se debe sembrar en forma paralela una cepa control de *E. coli* con 10 ml de Diluyente Butterfield's Tamponado y subsecuentes diluciones para obtener un recuento contable dentro del rango del método, como control positivo del método. Es posible utilizar otro procedimiento equivalente que proporcione valores contables.

5.3.2 Protocolo de trabajo.

- Rotular las placas Petrifilm® con la identificación de las muestras y la dilución correspondiente.
- Realice las actividades dentro del gabinete de bioseguridad.
- Colocar la placa Petrifilm® para Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos, en una superficie plana.

- Levantar el film superior y con la pipeta en forma perpendicular, colocar 1 ml de la muestra o su dilución en el centro del film inferior.
- Se debe utilizar pipetas estériles **diferentes** para transferir las distintas diluciones, salvo si se trabaja desde la más diluida a la más concentrada (Ejemplo: 10^{-2} a la 10^0).
- Bajar con cuidado el film superior sobre la muestra evitando que se formen burbujas de aire.
- Colocar el aplicador con la cara lisa hacia arriba en el centro de la placa.
- Presionar ligeramente el centro del aplicador para distribuir la muestra uniformemente. Distribuir el inóculo por toda el área de crecimiento del Petrifilm® antes de que se forme el gel. No deslizar el aplicador por el film.
- Retirar el aplicador y dejar la placa en reposo durante al menos un minuto para que el gel se solidifique.
- Por cada dilución existente siembre en una o dos placas.
- Incubar las placas en posición horizontal, cara arriba, en pilas de hasta 20 placas
- A continuación, proceda con la siembra de un control positivo.
- Incubar las placas Petrifilm® Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos por 48 ± 3 hrs a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.3.3 Almacenamiento de las Placas Petrifilm®.

- Guardar las bolsas de las Placas Petrifilm® refrigeradas o congeladas sin abrir a temperaturas de 8°C o inferiores. Justo antes del uso, dejar que las bolsas cerradas alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas. Volver a colocar las Placas 3M Petrifilm® que no se hayan utilizado en la bolsa. Sellar la bolsa plegando el extremo y colocando cinta adhesiva. Para evitar la exposición a la humedad, no refrigerar las bolsas abiertas.
- Almacenar las bolsas reselladas en un lugar fresco y seco por un período máximo de cuatro semanas. Se recomienda que las bolsas reselladas se guarden en un congelador si la temperatura del laboratorio excede los 25°C y/o el laboratorio se encuentra en una región con humedad relativa que excede el 50% (excepto en instalaciones con aire climatizado).
- Para guardar bolsas abiertas en un congelador, colocar las Placas Petrifilm® en un recipiente hermético. Para usarlas nuevamente, se debe abrir el recipiente y retirar sólo las necesarias; luego volver a colocar inmediatamente las placas restantes en el recipiente hermético y almacenarlo en el congelador.
- No se deben usar las Placas Petrifilm® que hayan excedido la fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento y el número de lote figuran en cada paquete y en cada una de las placas.

- El congelador que se usa para el almacenamiento de las bolsas abiertas no debe tener un ciclo de descongelación automática dado que esto puede dañar las placas debido a una reiterada exposición a la humedad.
- No se deben utilizar las Placas Petrifilm® que presenten decoloración.

5.4. Cálculo y expresión de los resultados

- Contabilizar todas las **colonias rojas de borde regular**, independientemente del tamaño o intensidad en el color.
- El área de crecimiento circular del Petrifilm® es aproximadamente de 20 cm². Pueden realizarse estimaciones en placas que contengan más de 300 colonias contando el número de colonias en uno o más cuadrados representativos y obteniendo el promedio. Multiplicar dicho número por 20 para obtener el recuento total por placa.
- Altas concentraciones de colonias en las placas ocasionarán que toda el área de crecimiento se vuelva roja o rosada. Ocasionalmente, en placas demasiado cargadas, el centro de la placa puede carecer de colonias visibles, pero pueden apreciarse muchas colonias pequeñas en los bordes. Cuando esto ocurre, diluir más la muestra para obtener un recuento más preciso.
- Algunos organismos pueden licuar el gel, pudiéndose producir una difusión que oculte la presencia de otras colonias. Si la licuación del gel interfiere con el recuento, debe realizarse un recuento estimado contando las áreas no afectadas.
- Si no es posible realizar el recuento en un lapso inferior a 1 hora luego de terminada la incubación, las placas pueden conservarse en congelación, en un recipiente hermético, a temperaturas menores o iguales a los - 15°C por un máximo de una semana, para efectuar el conteo. Esto es sólo para casos de emergencia, no se debe establecer como procedimiento rutinario.

5.4.1 Cálculo e informe de los recuentos en placa

- • Seleccionar las placas que presenten un rango de conteo entre **30 – 300 colonias**.
- Para muestras de **piel de cuello**, en caso de realizar diluciones en duplicado se deben promediar el N° colonias encontradas en ambas placas de la misma dilución y multiplicar por el inverso de la dilución. En caso de realizar sólo una placa en diluciones consecutivas, registrar el número de colonias de cada dilución, multiplicar por el inverso de la dilución y luego determinar el promedio del recuento bacteriano entre ambas diluciones.
- Utilizar notación científica para el informe de resultados.
- Los recuentos se informarán con 2 dígitos. Cuando el tercer dígito es 5, agregar una unidad al segundo dígito si éste es impar y mantener el segundo dígito si éste es par.
- Se informará como UFC/ g.
- En el caso de valores obtenidos sobre o bajo el rango deben ser informados como Recuento Estimado en Placa (RESP).

**INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE
MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA
PETRIFILM® AOAC OFFICIAL METHOD 990.12**

Código: D-ATR-AAT-14

Versión: 03

- En caso de recuentos incontables se informará como Muy Numeroso Para Contar (MNPC).
- En caso de no obtener desarrollo en las placas se debe informar de acuerdo al límite de detección de la técnica.

Ejemplo: < 10 UFC / g en Muestras de piel de cuello de ave en dilución 10⁻¹.

6. REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS

- Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del SAG, el cual debe contener la firma, timbre y nombre del responsable del laboratorio.
- El responsable del laboratorio debe enviar los resultados en el Protocolo Oficial del SAG al MVO, este último, una vez que verifique los datos remitidos en el protocolo, despachará los resultados, de acuerdo a lo señalado en el Documento General "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación ", versión vigente.

7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

De conformidad con lo señalado en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/ensayo, Convenio de autorización y el presente instructivo técnico; todo laboratorio autorizado deberá ser supervisado por el SAG, a través una visita de supervisión al año a las dependencias del laboratorio.

Una vez realizada la visita de supervisión, se generará un informe, el que indicará las no conformidades y observaciones encontradas, las que deben ser respondidas por el laboratorio autorizado en los plazos estipulados en dicho informe.

Estas acciones de supervisión, se efectuarán sin perjuicio de las facultades de fiscalización que tiene el Servicio.

Como se indicó anteriormente, el informe describirá las no conformidades u observaciones, las cuales deberán ser respondidos por el Laboratorio Autorizado, en un plazo no superior a 10 días hábiles. Posteriormente, al recibir esta respuesta, el Servicio realizará una revisión documental de éstas, pudiendo solicitar más antecedentes, si así lo requiere, por las vías institucionales de comunicación disponibles. Luego de ello, se efectuará una segunda revisión, si así se requiere. Si después de esta revisión, existieran no conformidades críticas que no puedan ser subsanadas, por parte del Laboratorio Autorizado, pasarán a considerarse un incumplimiento.

Por cada una de las supervisiones adicionales a la establecida en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, en las que el personal del SAG deba ir a las dependencias del laboratorio, para verificar el cumplimiento de las no conformidades, el tercero deberá pagar la tarifa respectiva por cada una de ellas. A excepción de que la supervisión adicional sea por un objetivo distinto determinado por el Servicio.

En caso que, los supervisores SAG detecten que las no conformidades e incluso los incumplimientos, se deben al actuar del Responsable Técnico, el Servicio podrá sugerir al autorizado, en el informe de supervisión, que postule a un nuevo Responsable Técnico.

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento RED SAG de Laboratorios detecta faltas en el desempeño del Laboratorio Autorizado, que afecten negativamente el resultado del Programa Oficial asociado a su autorización, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, el SAG podrá instruir al Laboratorio Autorizado mediante una carta suscrita por el/la Jefe (a) del Departamento de Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización.

Lo anterior es sin perjuicio de la aplicación de una medida por incumplimiento o revocación de la resolución, según las causales establecidas en la Resolución N° 3571 de 2021, Convenio de Autorización y el Reglamento Específico correspondiente.

En caso de revocación, el autorizado afecto a tal medida, quedará inhabilitado para postular nuevamente a esta autorización, por el plazo de dos (2) años contados desde la fecha en que quede ejecutada la resolución que establece esta medida.

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

Los laboratorios deberán participar en programas de ensayos interlaboratorios nacionales y/o internacionales que incorporen el análisis del alcance, al menos una vez al año, cuyos resultados deberán ser remitidos al Departamento RED SAG de Laboratorios. El laboratorio autorizado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales y/o internacionales, en el momento que el SAG lo requiera.

8 OBLIGACIONES

El tercero Autorizado deberá cumplir con lo establecido en el Reglamento General, Convenio de Autorización, Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos y las siguientes obligaciones específicas del presente Instructivo Técnico:

- Seguir los protocolos establecidos en los puntos 4, 5, 6 y 7 del presente Instructivo Técnico.

9. FORMULARIO

Código	Nombre
F-ATR-AAT-263	Lista de responsables técnicos y analista(s) del laboratorio vinculado al análisis



Lista De Responsables Técnicos y Analista(s) Del Laboratorio
Vinculado Al Análisis

Código F-ATR-AAT-263
Versión: 01

Identificación del Laboratorio

Razón Social:

RUT:

Nombre completo	Cargo que desempeña. Responsable técnico y subrogante (RT) o analista (A)*	Nº Cédula identidad	Firma	Técnicas autorizadas

Este anexo debe ser actualizado cada vez que hay modificaciones del personal involucrado en el proceso de autorización, se debe considerar los subrogantes.

Firma del Representante Legal

Fecha: ____/____/____