



SAG
Ministerio de
Agricultura

Gobierno de Chile

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECuento DE
MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS
MEDIANTE TÉCNICA TEMPO® AC BIO 12/35-05/13
Y RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE
TÉCNICA TEMPO® EB BIO 12/21-12/06**

Código: D-GF-CGP-PT-030
Versión:01

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECuento DE
MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE
TÉCNICA TEMPO® AC BIO 12/35-05/13 Y RECuento DE
ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE TÉCNICA
TEMPO® EB BIO 12/21-12/06**

Contenido

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | OBJETIVO Y ALCANCE..... | 3 |
| 2. | REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS | 3 |
| 3. | DEFINICIONES Y ABREVIATURAS | 4 |
| 4. | REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN..... | 4 |
| 4.1. | Requisitos de infraestructura, equipos, instrumentos y materiales..... | 4 |
| 4.1.1 | Infraestructura | 4 |
| 4.1.2. | Equipos, instrumentos y materiales | 5 |
| 4.2 | Requisitos del personal | 5 |
| 4.3 | Requisitos específicos y consideraciones | 6 |
| 4.3.1. | Requisitos específicos..... | 6 |
| 4.4 | Medios de verificación de requisitos..... | 7 |
| 4.4.1. | Solicitud de autorización..... | 7 |
| 5. | ANÁLISIS/ENSAYO | 8 |
| 5.1. | Captación y envío de la muestra | 8 |
| 5.2. | Recepción y manejo de la muestra | 9 |
| 5.3. | Metodología | 9 |
| 5.3.1 | Consideraciones Generales para la Técnica | 9 |
| 5.3.2 | Preparación de las muestras | 10 |
| 5.3.3 | Preparación del Equipo TEMPO® | 10 |
| 5.3.4 | Control de Calidad | 11 |
| 5.3.5 | Preparación de Frasco | 13 |
| 5.3.6 | Estación de Llenado. Carga de las muestras..... | 13 |
| 5.3.7 | Estación de Lectura de Tarjetas..... | 15 |
| 5.4. | Cálculo y expresión de los resultados | 15 |
| 6. | REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS | 16 |
| 7. | SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS..... | 16 |
| 8. | MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO | 16 |
| 9. | ANEXOS..... | 17 |

1. OBJETIVO 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 los análisis/ensayo para el **Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos (AC) y Recuento de Enterobacteriaceae (EB) mediante el método rápido: Técnica TEMPO® AC BIO 12/35-05/13 y TEMPO® EB BIO 12/21-12/06**, 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 tejido superficial de canal en carnes rojas, de las especies bovino, caprino, ovino y porcino (método destructivo)**. La realización del análisis de estas muestras corresponde a muestreos microbiológicos oficiales tomados desde plantas de faena para carnes de exportación.

2. REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Ley 18.755. Establece normas sobre organización y atribuciones del Servicio Agrícola y Ganadero.
- D.L. N° 3.557 de 1980, del Ministerio de Agricultura. Establece disposiciones sobre Protección Agrícola.
- D.S. N° 3 de 1982, del Ministerio de Agricultura. Establece requisitos para ejecutar labores de muestreo y análisis de plaguicidas y fertilizantes bajo convenio.
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- Resolución Exenta N° 529 de 2012, del Servicio Agrícola y Ganadero. Norma el Sistema Nacional de Autorización de Terceros.
- Resolución Exenta N° 90 de 2014, del Servicio Agrícola y Ganadero. Aprueba el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo.
- Reglamento específico para la Autorización de Laboratorios Análisis/Ensayo. versión vigente.
- Documento General "Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras 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 01. 97. Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones - Parte 1: Análisis físico-químicos y microbiológicos en procesos industriales.
- ISO 11133:2014 "Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media". Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones - Parte 1: Análisis físico-químicos y microbiológicos en procesos industriales
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá Versión vigente.
- Instrucciones del Fabricante para el Producto TEMPO® AC BIO 12/35-05/13 y TEMPO® EB BIO 12/21-12/06, versión vigente.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- Protocolo Oficial SAG: Documentos emitidos por profesionales del SAG: "Protocolo de Toma de Muestra Oficial RAM. Programa Reducción de Patógenos", y "Protocolo de Toma de Muestra Oficial Enterobacterias. Programa Reducción de Patógenos".
- AC: Recuento de microorganismos Aerobios Mesófilos.
- EB: Enterobacteriaceae
- SAG: Servicio Agrícola y Ganadero.
- ISO: International Organization for Standardization
- AFNOR: Association Française de Normalisation (Organización de Normalización Francesa).
- SAC: Sistema de Aseguramiento de la Calidad.
- MVO: Médico Veterinario Oficial del SAG.
- INN: Instituto Nacional de Normalización.
- NCh: Norma Chilena.

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 Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo como lo definido en el presente instructivo.

4.1. Requisitos de infraestructura, equipos, instrumentos y materiales

4.1.1 Infraestructura

- Infraestructura requerida para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

- Equipamiento básico para realizar las actividades comprendidas en el alcance de la habilitación, de acuerdo a requisitos señalados en 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.

4.1.2. Equipos, instrumentos y materiales

- Bolsas resellables estériles con filtro TEMPO
- Etiquetas (identificación de muestras) o lápiz marcador indeleble.
- Pipetas graduadas estériles o micropipetas para dosificar 0.1 ml y 1.0 ml.
- Propipetas automáticas o equivalentes.
- Material estéril para contener los volúmenes de Diluyente:
- Diluyentes primarios para alimento: Agua de Peptona Tamponada estéril (APT).
- Diluyentes secundarios: agua destilada estéril.
- Dispensador de 10 ml ajustado en 3ml.
- Micropipetas (100 ul o 1000 ul).
- Puntas desechables estériles para micropipetas.
- Probeta estéril 100 ml.
- Stomacher.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Vortex o Agitador de Tubos.
- Estufa de Incubación a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Estufa de Incubación a $35^{\circ} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Equipo Sistema de Llenado de Tarjetas y Diluciones TEMPO® (TEMPO® Filler).
- Equipo Sistema de Lectura de Tarjetas TEMPO® (TEMPO® Read).
- Kit Análisis TEMPO® (Tarjetas y Medios de Cultivo).
- Dispensador de alcohol al 70%.
- Bandejas de incubación.
- Bandejas de carga.
- Refrigerador.
- Congelador.

4.2 Requisitos del personal

Las personas jurídicas interesadas en postular a la autorización en esta área, deben cumplir con todo lo establecido tanto en el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo como lo definido en el presente Instructivo Técnico y deberá contar con servicios permanentes de profesionales capacitados y competentes para el Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos (AC) y Recuento de Enterobacteriaceae (EB) mediante el método rápido: Técnica TEMPO® AC BIO 12/35-05/13 y TEMPO® EB BIO 12/21-12/06.

a) Responsable técnico:

Según se indica en el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios análisis/ensayo (Numeral 4.2), el laboratorio debe contar con un responsable técnico, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado. Este responsable técnico, debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Poseer título profesional otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera del área Biológica de al menos ocho semestres académicos. 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 análisis de laboratorio de al menos dos (2) años, uno de ellos en el área de bacteriología.
- Haber recibido capacitación en la realización del Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos (AC) y Recuento de Enterobacteriaceae (EB) mediante el método rápido: Técnica TEMPO® AC BIO 12/35-05/13 y TEMPO® EB BIO 12/21-12/06, 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.
- El responsable técnico debe tener un subrogante, el que deberá cumplir los mismos requisitos indicados en el punto anteriormente descrito.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en la/s metodología/s que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

b) 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 el Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos (AC) y Recuento de Enterobacteriaceae (EB) mediante el método rápido: Técnica TEMPO® AC BIO 12/35-05/13 y TEMPO® EB BIO 12/21-12/06, en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la autorización, comprobable mediante certificado correspondiente.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

4.3 Requisitos específicos y consideraciones

4.3.1. Requisitos específicos

- Los laboratorios, deben contar con un sistema de aseguramiento de calidad implementado y su respectivo manual de aseguramiento de la calidad, siguiendo las directrices de la Norma ISO 17.025.
- El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión 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.
- 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 acreditación de éstas ante el INN.
- 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.
- El Laboratorio debe contar y enviar los siguientes documentos:
 - Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la autorización.
 - Procedimiento e Instructivos Preparación 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 Material de Lavado.
 - 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 involucrados en el alcance de la autorización.
 - 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.

El cumplimiento de estos requisitos será confirmado por el Servicio 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.

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de autorización, además de los antecedentes establecidos en el numeral 6.1 del 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:

- Documentación que demuestre la capacitación y competencia técnica del responsable técnico identificado y de los analistas involucrados en la técnica del alcance de autorización, según lo descrito en el numeral 4.2 de este instructivo.
- Lista de los analistas vinculados a la técnica, de acuerdo al formato indicado en el Anexo N° 9.1 de este instructivo. Este listado debe incluir a los analistas participantes en el análisis/ensayo.
- Currículo del Responsable Técnico y de los analistas, involucrados en el alcance de autorización.
- Certificado de título del Responsable técnico y de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Copia del manual de aseguramiento de la calidad del laboratorio.
- Organigrama de personal. Indicando los nombres, profesión y cargos del responsable técnico 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.
- Plano o 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 y calibración de estos.
- Lista de materiales, reactivos y Kits.
- Instructivos específicos, señalados en el numeral 4.3 de este Instructivo.

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

Con este fin, el SAG podrá someter al responsable técnico y a uno o más analistas identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica, según se estime necesario..

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 al menos la identificación de cada una de ellas, el tipo de muestras, la fecha y la hora de la recolección de éstas.

Lo anterior, debe realizarse de acuerdo a lo definido en el Documento General "Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras de exportación. 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 "Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras de exportación. SAG". Última versión vigente. Cabe señalar, la importancia de verificar los siguientes puntos:

- Temperatura de recepción (rango aceptado: 4- 8 °C).
- Tiempo entre la toma de muestras y la recepción, ya que deben ser procesadas dentro de las 24 horas desde la toma de las muestras.
- Integridad de las muestras.
- Cantidad suficiente de muestras para el análisis.
- Identificación adecuada.
- Contenedor con sello SAG intacto.
- Protocolo fuera del contenedor y con los datos requeridos de acuerdo al Documento General anteriormente mencionado.

5.3. Metodología

5.3.1 Consideraciones Generales para la Técnica

- Cumplir con las Buenas prácticas de laboratorio.
- No utilice los reactivos o los materiales desechables después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Antes de usarlos, compruebe que el envase y los componentes están intactos.
- Utilice solamente los medios de cultivo que parezcan homogéneos (sin grumos ni humedad).
- No utilice tarjetas visiblemente deterioradas.
- No usar tarjetas que no hayan sido selladas por el equipo de Llenado TEMPO®.
- No escribir en los pocillos de la tarjeta ni en los códigos de barra.
- No pegar etiquetas sobre la tarjeta.
- La tarjeta TEMPO® no está destinada para realizar subcultivos de los pocillos positivos.
- El equipo de Llenado y de Lectura TEMPO® y las gradillas de tarjetas deben limpiarse y descontaminarse periódicamente.

5.3.2 Preparación de las muestras

- Las muestras deben provenir del control oficial de plantas de faena de exportación y haber sido tomadas por el Médico Veterinario Oficial SAG (MVO). Estas muestras son ingresadas al Laboratorio adjuntando el Protocolo oficial SAG, el cual debe consignar todos los datos de la (s) muestra (s).
- Estas muestras corresponderán a **tejido superficial de canal en carnes rojas** obtenidas por **método destructivo**, mediante el cual se consiguen cuatro muestras de tejido de aproximadamente **5 cm²**, cuya superficie total será de **20 cm²**.
- El análisis de las muestras debe ejecutarse **antes de transcurridas 24 horas desde la hora de la toma de muestras**. Es por esta razón que el laboratorio debe considerar el tiempo necesario para las actividades de ingreso, distribución e inicio de análisis. Las muestras que no cumplan con este requisito serán rechazadas.
- Las muestras deben manipularse dentro del gabinete de bioseguridad.
- Las muestras deben ser **utilizadas en su totalidad**, para lo cual una vez ingresadas al Laboratorio, se les procederá a adicionar **100 ml de APT** a cada bolsa de Stomacher que las contiene.
- Una vez hidratadas, se deben homogenizar mediante el uso de Stomacher, al menos por dos minutos.
- La suspensión cárnica homogeneizada en la bolsa Stomacher, no constituye una dilución. Esto se debe tener en consideración al hacer el cálculo, como **"dilución 10⁰"**.
- El intervalo **entre la homogenización de la dilución primaria y su transferencia a la tarjeta TEMPO® NO DEBE superar los 45 minutos**, a menos que en la norma internacional especifique lo contrario.

5.3.3 Preparación del Equipo TEMPO®

a) Encendido:

Presione el botón que esta al costado (ON) y encienda el equipo de llenado (la puerta debe estar cerrada y sin bandeja en su interior).

- Auto-test auto-inicia.
- Control del ciclo de depresión.
- Prueba de los diferentes componentes.
- Filler listo para ser usado.

b) Preparación de los dispensadores:

Se deberá trabajar con un dispensador para agua en volumen de 3 ml, antes de comenzar a trabajar, se verificará el estado del volumen dispensado.

c) Ingreso de Muestras al Equipo TEMPO®

- Abrir la aplicación **"tempo prep"**.
- Ingresar clave de acceso.
- Teclar F8 e ingresar muestras. Seleccionar con el cursor la muestra que será analizada, dar "enter". La muestra deberá quedar en color "verde".

- Trabajar a partir de la dilución inicial **10⁰** y cargar en el equipo TEMPO®, de acuerdo a:
 - **AC 1: 4 sin diluir matriz**
 - **EB 1: 4 sin diluir matriz.**
- Incubar de acuerdo a los parámetros establecidos (ver punto 5.3.6, letra u). Luego efectuar la lectura de resultados.
- La dilución se puede aumentar según el nivel esperado de contaminación de las muestras o de acuerdo a los resultados que se vayan obteniendo en el tiempo. Para esto considerar los volúmenes que se deben dispensar, tanto para el diluyente secundario como para la muestra, indicados en el Punto 5.3.6. (NOTA).
- Se deben considerar las siguientes **Precauciones:**
 - Verificar siempre el color de la tarjeta para identificación del parámetro.
 - Tener cuidado al sacar la tarjeta, tratar de que la punta de la manguera no roce con la caja. Posible contaminación bacteriana.
 - Verificar el correcto corte y llenado de la tarjeta.

d) Validar Test de ensayo:

De acuerdo al test de trabajo, pasar códigos de barra por la pistola para validar cada frasco de reactivo.

5.3.4 Control de Calidad

a) Control de Calidad para TEMPO® AC

- La calidad de los reactivos del sistema TEMPO® se controla sistemáticamente en varias etapas de su fabricación. El personal de aseguramiento de calidad para asegurarse de que el método TEMPO se ha llevado a cabo correctamente, puede utilizar las siguientes cepas:
 - *E.coli* ATCC 25922.
 - *Bacillus subtilis* ATCC 6633.
- Los distintos pasos de incubación se deben realizar a 30±1°C.
- Utilizando cultivo de 24 hrs en agar TSA, prepare una suspensión en Agua de Peptona y ajustar a aproximadamente 10⁸ UFC/ml para *E.coli* y 10⁷ UFC/ml para *B.subtilis* (corresponde más o menos 0,4 Mc Farland y 0,8 Mc Farland).
- Realizar diluciones seriadas decimales en agua de peptona hasta obtener una concentración teórica de 10² UFC/ml.
- Por cada cepa transfiera 1 ml de esa suspensión a un vial de medio de cultivo que se haya reconstituido antes con 3 ml de agua destilada estéril.
- Modificar dilución predeterminada en el software TEMPO® introduciendo "4" para obtener dilución 1/4.
- Modificar la unidad predeterminada en el software TEMPO® seleccionando "Ninguna unidad".
- Llenar una tarjeta por vial de medio e incubar.
- Al mismo tiempo comprobar la concentración de la suspensión que se usó para inocular la tarjeta TEMPO® sembrando por estrías 0,1 ml de la suspensión 10³ UFC/ml en TSA. Incubar.
- Al final de la incubación de las placas, contar el número de colonias en TSA.
- Intervalo de resultados esperados:

Para las dos cepas, calcule la proporción R:

$$R = \frac{\text{Resultado TEMPO}^{\circledR}}{\text{N}^{\circ} \text{ colonias en TSA}}$$

- Para ambas cepas, el **valor R** debería estar **entre 0,1 y 0,10**.
- Si los resultados de recuentos obtenidos se desvían de los valores esperados, contactar con Biomerieux S.A. o su representante local.

b) Control de Calidad para TEMPO® EB

• La calidad de los reactivos del sistema TEMPO se controla sistemáticamente en varias etapas de su fabricación. Los usuarios de calidad para asegurarse de que el método TEMPO se ha llevado a cabo correctamente, pueden utilizar las siguientes cepas:

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *E.coli* ATCC 25922.
- *Salmonella* entérica serovar Typhimurium ATCC 14028.

- Los distintos pasos de incubación se deben realizar a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Utilizando cultivo de 24 hrs en agar TSA, prepare una suspensión en Agua de Peptona y ajustar a 0,5 Mc Farland es decir, unos 10^8 UFC/ml.
- Realizar diluciones seriadas decimales en agua de peptona hasta obtener una concentración teórica de 10^2 UFC/ml.
- Para *E.coli* y *S. entérica* serotipo Typhimurium transfiera 1 ml de esta suspensión a un vial de medio de cultivo que haya sido reconstituido previamente con 3 ml de agua destilada estéril.
- Siga el mismo procedimiento para *E. faecalis*, pero transfiera 1 ml de la suspensión de 10^6 UFC/ml.
- Modificar dilución predeterminada en el software TEMPO® introduciendo "4" para obtener dilución $\frac{1}{4}$.
- Llenar una tarjeta por vial de medio e incubar.
- Al mismo tiempo comprobar la concentración de la suspensión que se usó para inocular la tarjeta TEMPO® sembrando por estrías 0,1 ml de la suspensión 10^3 UFC/ml en TSA. Incubar.
- Al final de la incubación de las placas, contar el número de colonias de *E.coli* y *S. entérica* serotipo Typhimurium y compruebe la presencia de *Enterococcus faecalis* sobre el TSA.
- Rango de resultados esperados:
 - Cepa no entérica: El test TEMPO® EB debería inhibir totalmente las cepas de *E.faecalis*, en cuyo caso el software TEMPO® indica <1 UFC/g.
 - Cepas entérica: Se trata de *E.coli* y *S. entérica* serotipo Typhimurium.

Calcular la proporción R:

$$R = \frac{\text{Resultado TEMPO}^{\circledR} \text{ (UFC/g)}}{10 \times \text{N}^{\circ} \text{ colonias en TSA}}$$

- Para ambas cepas, el **valor R** debería estar situado **entre 0,01 y 1**.
- Si los resultados de recuentos obtenidos se desvían de los valores esperados, contactar con Biomerieux S.A. o su representante local.

5.3.5 Preparación de Frasco

- Realizar la re-hidratación del medio en el frasco con agua destilada esterilizada, con 3 ml (debe ser realizado antes de agregar la muestra). Homogenizar en vortex. Colocar en las bandejas de carga, los frascos del parámetro a determinar, previamente hidratados.
- Para efectuar el control del volumen dispensado por Peso, seguir los siguientes pasos:
 - Talar el frasco en la balanza.
 - Dispensar 5 volúmenes del medio de dilución secundario en el frasco (5 x 3 ml).
 - Pesar el frasco utilizando la balanza (de ser necesario, restar el peso del frasco)
 - Verificar que el peso del volumen del medio de dilución secundario se encuentren dentro de los rangos aceptables: **14,4 – 15,6 gr para un volumen dispensado de 5 x 3 ml** (en caso de ser necesario dispensar 5 x 3,9 ml, el rango aceptable será de 18,6 – 20,4 gr).
 - Si el volumen dispensado del medio de dilución secundario no se encuentra en el rango aceptado: Girar la perilla del dispensador para ajustar el volumen, ya sea aumentando o disminuyendo el volumen dispensado y repetir la verificación.

5.3.6 Estación de Llenado. Carga de las muestras

- a) Tomar el número necesario de viales de medio de cultivo (un vial por cada muestra que se analice) y espere a que alcancen la temperatura ambiente.
- b) El dispensador que contiene el diluyente secundario se debe regular a **3 ml para el análisis TEMPO® AC y para el TEMPO® EB.**
- c) Cebear la bomba eliminando los dos primeros volúmenes dosificados.
- d) Iniciar sesión en la Estación de Preparación TEMPO.
- e) Seguir las instrucciones de la interfaz de usuario de la estación de Preparación: Identificar las muestras que serán analizadas ingresando con la ayuda del teclado o lector de códigos de barras de la estación de Preparación.
- f) Con ayuda del dispensador reconstituir el medio de cultivo dosificando **3 ml de diluyente secundario** por vial, para el caso de análisis **TEMPO® AC** y para el **TEMPO® EB.**
 - Con una pipeta estéril tomar: **1 ml de la bolsa que contiene la muestra** y transferir al vial que contiene el medio de cultivo reconstituido. Luego homogenizar durante **5 segundos** con agitador vortex **para el caso de análisis TEMPO® AC** y durante **3 segundos para el caso de análisis TEMPO® EB.** Los 4 ml de medio inoculado obtenidos corresponden a una **dilución de 1/4 de la muestra** (permite el recuento entre 1 y 4.900 UFC/ml).
- g) Retirar la tarjeta por cada vial inoculado, SIN TOCAR, la punta del tubo de transferencia.
- h) Comprobar que los códigos de barras del medio inoculado y la tarjeta y del vial del medio inoculado coinciden.
- i) Asociar el identificador de la muestra que será analizada con los código de barra del medio inoculado y las tarjetas correspondientes, con ayuda del lector de código de barra de la estación de Preparación y siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario de la Estación de Preparación.
- j) Ponga el vial que contiene el medio inoculado en la gradilla de llenado.

- k) Insertar la tarjeta en la ranura frente al vial, introduciendo el tubo de transferencia de la tarjeta dentro del vial.
- l) La gradilla puede alojar 6 viales con sus tarjetas y permite el llenado simultáneo de 1-6 tarjetas TEMPO®.
- m) Insertar la gradilla en el equipo de Llenado TEMPO® (TEMPO® Filler) y comience el ciclo de llenado. El medio inoculado se aspira por completo en la tarjeta.
- n) Después de completado el llenado de las tarjetas el equipo de Llenado TEMPO® corta y sella los tubos de transferencia. El equipo emitirá sonido una vez realizado el corte y llenado de tarjeta y parpadeará luz verde. Todas estas operaciones se realizan automáticamente y tardan unos 3 minutos.
- o) El ciclo de llenado es el mismo que para todos los parámetros y permite llenar al mismo tiempo tarjetas para parámetros diferentes.
- p) Retirar la gradilla de llenado de equipo de Llenado TEMPO® y comprobar visualmente que los viales están vacíos.
- q) Retirar la tarjeta de la gradilla y transferirlas a las gradillas de incubación.
- r) Insertar las tarjetas en las ranuras, con sus etiquetas orientadas hacia el usuario (hacia el asa de la gradilla).
- s) Las tarjetas que deban incubarse a la misma temperatura deben agruparse en la misma gradilla. Cada gradilla puede alojar 20 tarjetas. **No inserte tarjetas entre las ranuras.**
- t) Desechar los viales y tubos de transferencia usados en un contenedor de residuos apropiado, resguardando las medidas de bioseguridad.
- u) Incubar las tarjetas de acuerdo a:

| Test | Temperatura de incubación | Tiempo de incubación |
|----------|---------------------------|----------------------|
| TEMPO AC | 30° ± 1°C | 24-28 hrs |
| TEMPO EB | 35° ± 1°C | 22-27 hrs |

NOTA: El tiempo de incubación para el análisis es administrado por el software TEMPO® Read, que integra un intervalo teórico de 15 minutos entre la lectura del código de barras de la tarjeta y el comienzo de la incubación.

Si el intervalo real fuese superior a 15 minutos (sin exceder las 2 horas), este tiempo extra tendría que añadirse al tiempo de incubación restante mostrado por el software TEMPO® Read con el fin de cumplir estrictamente el tiempo real de incubación. La lectura siempre debe llevarse a cabo dentro del tiempo límite autorizado por el software.

| Dilución | Intervalo | Volumen del diluyente secundario | Volumen de la muestra |
|----------|--|----------------------------------|-------------------------------------|
| 1/4 | De 1 a 4.900 UFC/ml. | 3,0 ml. | 1 ml de muestra pura. |
| 1/40 | De 10 a 4,9 x 10 ⁴ UFC/ml. | 3,0 ml. | 1 ml de dilución 10 ⁻¹ |
| 1/400 | De 10 ² a 4,9 x 10 ⁵ UFC/ml. | 3,9 ml. | 0,1 ml de dilución 10 ⁻¹ |
| 1/4000 | De 10 ³ a 4,9 x 10 ⁶ UFC/ml. | 3,9 ml. | 0,1 ml de dilución 10 ⁻² |

5.3.7 Estación de Lectura de Tarjetas

- a) Inicie una sesión en la estación de Lectura.
- b) Abrir la aplicación TEMPO® READ.
- c) Insertar en equipo de Lectura TEMPO® la gradilla de incubación que contiene las tarjetas que hay que leer ordenadas desde la 1 al 20 y apretar "Start". El equipo emitirá sonido una vez realizado la lectura y parpadeará luz verde.
- d) El lector explora el código de barras de cada tarjeta e interpreta los resultados de fluorescencia de los pocillos. Se asocia automáticamente el identificador de la muestra con el tipo de análisis, la dilución y los resultados del recuento.
- e) Para el caso de análisis **TEMPO® AC**: Se puede aplazar la lectura de las tarjetas de acuerdo al test que este analizando, al final de la incubación, almacenándolas a 2-8°C tras su incubación durante un máximo de 48 horas. En este caso, deje que las tarjetas alcancen la temperatura ambiente (aproximadamente 5-15 minutos) antes de introducir las en el lector. La activación del tipo y la gestión de la refrigeración deben haberse configurado antes en "**TEMPO Admin**". Esta función permite que la advertencia "tarjeta leída demasiado tarde" respecto de un resultado de análisis, sea sustituida por un mensaje que indique que la "tarjeta se ha refrigerado". El usuario también puede anotar en el apartado de comentarios que las tarjetas se leyeron después de la refrigeración.

Para el caso de **TEMPO® EB**, esta opción se considera fuera del alcance de la certificación NF Validation (Nº BIO 12/21-12/06), por lo que de utilizarla, el Laboratorio deberá validar este proceso internamente y demostrar que no existen cambios en los resultados.

- f) Una vez completada la lectura, el ordenador analiza automáticamente los resultados y detecta pocillos positivos.
- g) Abrir la aplicación TEMPO READ, Presione F5 y filtrar los datos leídos.
- h) Edición de resultados: En la pantalla de la Estación de Lectura, se asocia el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo o mililitro de producto inicial, con el identificador de la muestra, el parámetro analizado y la fecha del análisis.
- i) La interfaz de usuario de la Estación de Lectura permite imprimir los resultados y también permite consultar los registros de los resultados obtenidos en los días anteriores. Se recomienda almacenar la información en archivos CSV y TED.
- j) Para verificar los datos almacenados: abrir la aplicación BMX SOFTWARE ir a la carpeta-biomeriux, tempo-export y verificar de acuerdo a las fechas de almacenamiento de datos.
- k) Al final del análisis, retire las tarjetas de la gradilla y deséchelas en un contenedor de residuos apropiado, resguardando las medidas de bioseguridad.

5.4. Cálculo y expresión de los resultados

- Cada uno de los resultados obtenidos por el sistema TEMPO® (UFC/ml), para posteriormente obtener el resultado en **UFC/ cm²**, se debe **multiplicar el número obtenido por 5** (20 cm² de superficie muestreada / 100 ml de dilución inicial, en donde **1 cm² corresponderán a 5 ml**. Tomando en cuenta que se traspasa 1 ml de cada dilución).
- El resultado se debe informar como **UFC/ cm²**, considerando dos cifras significativas, cuando corresponda.



INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECuento DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA TEMPO® AC BIO 12/35-05/13 Y RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE TÉCNICA TEMPO® EB BIO 12/21-12/06

Código: D-GF-CGP-PT-030
Versión:01

- Registrar estos resultados en la planilla de trabajo correspondiente, de acuerdo al sistema de aseguramiento de la calidad de cada Laboratorio.

6. REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS

Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del SAG, el cual debe contener la firma 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 cada una de las copias de acuerdo a lo señalado en el Documento General "Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras de exportación". Cabe señalar, que además debe mantener la copia rosada de los resultados para sus registros.

7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

Como señala el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, todo laboratorio autorizado será supervisado por el SAG, a través de la realización de inspecciones al laboratorio, al menos una visita al año.

El Servicio podrá realizar auditorías adicionales cuando lo estime conveniente. La respuesta a las No Conformidades y Observaciones encontradas durante la Auditoría, deberán ser contestadas por el Laboratorio Autorizado, en un plazo no superior a 10 días hábiles desde la recepción del informe de auditoría emitido por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias. La renovación de la autorización quedará supeditada a la emisión de un informe realizado por el Departamento de Laboratorios y estaciones Cuarentenarias, que indique que el Laboratorio Autorizado 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 de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias.

El laboratorio autorizado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales y/o internacionales, en el momento que el SAG lo requiera.

8. MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias detecta faltas en el desempeño del laboratorio autorizado, que pongan en riesgo el resultado del Programa Reducción de Patógenos asociado a su autorización, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al laboratorio autorizado mediante una carta suscrita por el/la Jefe/a del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o un Jefe/a de Oficina o un Director/a Regional, el cese inmediato de las prestaciones de servicios ejecutados dentro del alcance de su autorización hasta que se implementen y verifiquen todas las acciones correctivas, producto de las no conformidades detectadas .



**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECuento DE
MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS
MEDIANTE TÉCNICA TEMPO® AC BIO 12/35-05/13
Y RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE
TÉCNICA TEMPO® EB BIO 12/21-12/06**

Código: D-GF-CGP-PT-030
Versión:01

El Servicio tiene la facultad de aplicar medidas a los laboratorios autorizados que no cumplan con lo establecido en el Reglamento Específico de Autorización y el presente Instructivo Técnico, así como en el respectivo convenio de autorización, de acuerdo a las estipulaciones de este último.

El Servicio podrá, por resolución, aplicar las siguientes medidas en caso de incumplimiento por parte de los autorizados: a) suspensión de la autorización; y b) revocación de la autorización.

Las medidas señaladas se aplicarán a nivel nacional, y sin perjuicio de las sanciones que contemplan las leyes vigentes o garantías de fiel cumplimiento que el Servicio eventualmente puede exigir en los convenios de autorización.

Las suspensiones de la autorización durarán, al menos, el tiempo que requiera el laboratorio autorizado para implementar las medidas correctivas y su posterior verificación por parte del Servicio.

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.

9. ANEXOS



**LISTA DE ANALISTA(S) DEL LABORATORIO
VINCULADO AL DIAGNÓSTICO**

Código: F-GF-CGP-PT-135
Versión:01

| Nombre Completo | Nº Cédula de Identidad | Firma | Técnica que realiza |
|------------------------|-----------------------------------|--------------|----------------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....