



**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECUENTO DE
ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE
TÉCNICA PETRIFILM® AFNOR 3M 01/06-09/97**

Código: D-GF-CGP-PT-031
Versión:01

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECUENTO DE
ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE TÉCNICA
PETRIFILM® AFNOR 3M 01/06-09/97**

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, materiales y reactivos soluciones y medios de cultivo.....	4
4.1.1 Infraestructura	4
4.1.2 Equipos, instrumentos y materiales	5
4.1.3. Reactivos, soluciones y medios de cultivo	5
4.1.4. Estándares	5
4.2 Requisitos del personal	5
4.3 Requisitos Específicos	7
4.4 Medios de verificación de requisitos.....	8
4.4.1. Solicitud de autorización.....	8
5. ANÁLISIS/ENSAYO	9
5.1. Captación y envío de la muestra	9
5.2. Recepción y manejo de la muestra.....	9
5.3. Metodología	9
5.3.1 Preparación de las muestras	9
5.3.2 Protocolo de trabajo.....	10
5.3.3. Selección de las Colonias Características para el Recuento	11
5.4. Cálculo y expresión de los resultados	12
6. REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS	13
7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADO	14
8. MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO	14
9. ANEXOS.....	14

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 Enterobacteriaceae mediante el método rápido: Técnica Petrifilm® AFNOR 3M 01/06-09/97**, 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

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECuento DE
ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE
TÉCNICA PETRIFILM® AFNOR 3M 01/06-09/97**

Código: D-GF-CGP-PT-031
Versión:01

- 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".
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá. Versión vigente.
- ISO 6887-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions, versión vigente.
- ISO 6887-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products, versión vigente.
- ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations. Versión vigente.
- Instrucciones de 3M para el Producto Petrifilm® EB, versión vigente.

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- Protocolo Oficial SAG: Documentos emitidos por profesionales del SAG: "Protocolo de Toma de Muestra Oficial Enterobacterias. Programa de Reducción de Patógenos"
- 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, materiales y reactivos soluciones y medios de cultivo

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

- Stomacher.
- Bolsas para Stomacher estériles.
- Material estéril para contener los volúmenes de Diluyente de Agua Peptonada Tamponada (APT) estéril necesarios para el análisis.
- Pipetas graduadas estériles y/o micropipetas.
- Puntas para micropipetas.
- Probeta estéril.
- Tubos de ensayo estériles.
- Balanza digital.
- Etiquetas (identificación de muestras) o lápiz marcador indeleble.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Mechero.
- Vortex o Agitador de Tubos.
- Aplicador Petrifilm.
- Estufa de Incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Contador de colonias o equivalente.

4.1.3. Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Diluyente Agua Peptonada Tamponada estéril (de acuerdo a lo señalado en ISO 6887-1; 6887-2 e Instrucciones de 3M para el Producto Petrifilm® EB) en cantidad necesaria para procesar las muestras y además dispensada en 9 ml en tubos de ensayo para realizar las diluciones.
- No utilice diluyentes que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato en Placas 3M Petrifilm® EB.
- Placas Petrifilm® 3M, para Recuento de Enterobacteriaceae (EB) dentro del período de vigencia y conservadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.1.4. Estándares

Se utilizarán como estándares Cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) u otra equivalente, la cual será mantenida y utilizada de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726 y/o ISO 11133:2014. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas de colecciones de referencia, serán utilizadas tanto para el control de calidad de los medios de cultivo, como para el control del método de ensayo.

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

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AFNOR 3M 01/06-09/97	Código: D-GF-CGP-PT-031 Versión:01
--	---	---------------------------------------

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 Enterobacteriaceae mediante técnica Petrifilm® AFNOR 3M 01/06-09/97.

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 de 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 Enterobacteriaceae mediante técnica Petrifilm® AFNOR 3M 01/06-09/97, 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 Enterobacteriaceae mediante técnica Petrifilm® AFNOR 3M 01/06-09/97, 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

- 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.

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AFNOR 3M 01/06-09/97	Código: D-GF-CGP-PT-031 Versión:01
--	---	---------------------------------------

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 identificación 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 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.
 - El Protocolo que acompaña las muestras deberá ir fuera del contenedor y con los datos requeridos de acuerdo al Documento General anteriormente mencionado.

5.3. Metodología

5.3.1 Preparación de las muestras

- 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".
- Luego depositar 1 ml de la dilución 100 en una placa Petrifilm® para Recuento de Enterobacteriaceae (EB), de acuerdo a lo descrito en punto 5.3.2.
- Mezclar exhaustivamente la dilución 100, utilizando un agitador de tubos o vortex, entre 5 a 10 segundos. Luego, a partir de la dilución 100, tomar 1 ml y depositarlo en un tubo que contenga 9 ml de APT. Esta dilución es denominada 10-1.
- Mezclar bien la dilución 10-1 mediante el uso de un agitador de tubos o vortex. Luego, repetir lo anterior, para realizar la dilución 10-2. Continuar con al menos dos de estas 3 diluciones, de acuerdo a lo indicado en el punto 5.3.2.
- Para los tiempos máximos de preparación de diluciones decimales sucesivas e incorporación de éstas a placas, remítase a la Norma ISO 6887-1.
- Se debe utilizar pipetas estériles diferentes para realizar las distintas diluciones.
- De cada muestra se deberán inocular al menos dos diluciones sucesivas, buscando obtener recuentos dentro de los rangos establecidos.
- En caso de ser necesario, en muestras que por sus antecedentes se presuma que puedan presentar alta carga bacteriana, el laboratorio deberá realizar más diluciones sucesivas con el objeto de obtener placas con recuentos contables.

5.3.2 Protocolo de trabajo

- Rotular las placas Petrifilm® EB con la identificación de las muestras y la dilución correspondiente.
- Para comenzar la inoculación de las placas Petrifilm® EB, éstas deben ser colocadas en una superficie plana.
- Levantar el film superior y con la pipeta en forma perpendicular, agregar 1 ml de la dilución apropiada en el centro de la película 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 100).
- Bajar cuidadosamente el film superior sobre la muestra, para evitar que queden burbujas de aire atrapado.
- Colocar el **aplicador con la cara lisa hacia abajo** contra 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® EB antes de que se forme el gel. No deslizar el aplicador por el film.

- Retirar el aplicador y esperar al menos un minuto para permitir que se solidifique el gel.
- Por cada dilución existente siembre una placa. Recordar que la siembra deberá siempre considerar al menos dos diluciones sucesivas para cada muestra.
- Incubar las placas en posición horizontal, con la superficie transparente hacia arriba, en pilas de no más de 20 placas.
- Para este tipo de matrices incubar las placas Petrifilm® para Recuento de Enterobacteriaceae (EB) durante **24 ± 2 horas a 37°C ± 1°C**. Cabe señalar, que la Validación AFNOR Certificado N° 3M 01/06-09/97 Petrifilm® EB permite para "todos los productos alimenticios de consumo humano" la incubación "durante 24 ± 2 horas a 37°C ± 1°C ó a 30°C ± 1°C"; sin embargo, **se utilizará la temperatura de 37°C ± 1°C**.

5.3.3. Selección de las Colonias Características para el Recuento

- Las Enterobacteriaceae pueden producir colonias:
 - Color rojo **con** zonas amarillas (zonas ácidas) **con** burbujas de gas.
 - Color rojo **sin** zonas amarillas **con** burbujas de gas.
 - Color rojo **con** zonas amarillas **sin** burbujas de gas.
- Las colonias **no asociadas con gas** (una distancia mayor al diámetro de una colonia entre la colonia y la burbuja de gas) y **no asociadas con una zona amarilla, no se cuentan como Enterobacterias**.
- No se deben contar las colonias que están fuera del área delimitada, ya que no están dentro de la influencia selectiva del medio. Como tampoco aquellas burbujas producidas por el usuario, que puedan estar presentes.
- Altas concentraciones de colonias en las placas un obscurecimiento en el color del gel o la placa se volverá completamente amarilla, y tendrán alguna o ambas de las siguientes características: muchas colonias pequeñas y poco definidas, y/o muchas burbujas de gas. Cuando esto ocurra, registre los resultados como Muy Numerosos Para Contar (**MNPC**). Cuando se necesite un recuento real, utilice una placa con una dilución mayor.
- Si no se pudiera realizar el recuento de las Placas Petrifilm® EB, en el lapso de **1 hora luego de retirarlas de la incubadora**, se pueden guardar para enumerarlas en otro momento, congelándolas en un recipiente hermético a una temperatura menor o igual a -15 °C durante **un período máximo de una semana**. Esto es sólo para casos de emergencia, no se debe establecer como procedimiento rutinario.

5.4. Cálculo y expresión de los resultados

- Seleccionar las placas que presenten un rango de conteo entre **15 - 100 colonias**, de acuerdo a lo señalado por el fabricante 3M Petrifilm® AC.
- Calcule la cantidad de microorganismos presentes en cada dilución, de acuerdo a lo indicado en la Norma ISO 7218 vigente.
- Las estimaciones están fuera del alcance de la certificación de NF Validation por AFNOR Certification, **por lo tanto no se deben realizar Recuentos Estimados en Placa (RESP)**. En consecuencia no se deben realizar estimaciones en placas con recuentos superiores a las 100 colonias.
- Para que el **resultado sea válido**, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice, al menos en una placa que contenga un **mínimo de 10 colonias**.
- El número de microorganismos N presentes en la muestra para análisis, se calcula como la media corregida de **dos diluciones consecutivas** (escogiendo una placa por dilución), utilizando la ecuación:

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

Σ C = Es la suma de las colonias contadas en las dos placas escogidas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias.

V = Es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros.

d = es la dilución correspondiente a la primera dilución escogida (d= 1 cuando se utiliza en el producto líquido sin diluir, para muestras líquidas).

- El resultado calculado, se redondea a **dos cifras significativas**. Cuando se realiza esta operación, **si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior**; si la **tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad**.
- Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.
- Para las muestras de **tejido superficial de canal**, se debe realizar el cálculo mencionado anteriormente, tomado en consideración si se han efectuado o no duplicados en cada dilución. Posteriormente, para 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**.
- Ejemplo:

Recuentos:

Diluciones escogidas: 10⁻²: 168 colonias.
10⁻³: 14 colonias.

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECUENTO DE
ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE
TÉCNICA PETRIFILM® AFNOR 3M 01/06-09/97**

Código: D-GF-CGP-PT-031
Versión:01

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1.1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16.545$$

- Redondeando el resultado como se indicó anteriormente, el número de microorganismos es de 17.000, es decir, de **1,7 x 10⁴ que multiplicado por 5 = 8,5 x 10⁴ UFC/ cm²**.
- En caso de recuentos incontables (mayores a 300 colonias) se informará como Muy Numeroso Para Contar (**MNPC**).
- En caso de que existan recuentos **menores a 10 colonias**, pero como mínimo 4 colonias, el resultado se calculará siguiendo la fórmula indicada anteriormente y luego multiplicando por 5. Si el resultado oscila entre 1 y 3 colonias, la precisión del análisis es demasiado baja, por lo que el análisis se expresará de acuerdo al límite de detección (ver párrafo siguiente).
- En caso de no obtener desarrollo de colonias en las placas, se debe informar de acuerdo al **límite de detección de la técnica**. Esto es:

$$\frac{1 \times 5}{d}$$

Donde:

d = es la dilución correspondiente a la suspensión inicial o a la primera dilución inoculada o escogida (**d = 10⁰ = 1** cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

Ejemplo: **< 5 UFC / cm² → Muestras en dilución 10⁰**.

< 50 UFC / cm² → Muestras en dilución 10⁻¹.

- Para otros casos especiales de recuentos, remitirse a lo indicado en la Norma ISO 7218 vigente.
- El Analista debe registrar estos resultados en la Planilla de trabajo correspondiente, de acuerdo a la elaborada por cada laboratorio autorizado para este fin.

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 AUTORIZADO

Como señala el Reglamento Específico para la Autorización del laboratorio de análisis/ensayo, todo laboratorio autorizado será supervisado por el SAG, a través de la realización de inspecciones al laboratorio, como mínimo 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.

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-136
Versión:01

Nombre Completo	Nº Cédula de Identidad	Firma	Técnica que realiza

Firma del postulante o representante legal

Fecha,