

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

Tabla de Contenidos

Contenido	Página
1 Objetivos y Alcance	2
2 Referencias y Documentos Relacionados	2
3 Definiciones y Abreviaturas	3
4 Requisitos	3
4.1 Requisitos infraestructura equipos, materiales y reactivos	3
4.2 Requisitos de personal	4
4.3 Requisitos específicos	5
4.4 Medios de verificación de requisitos	6
5 Análisis/Ensayo	6
5.1 Captación y envío de la muestra	6
5.2 Recepción y manejo de la muestra	7
5.3 Metodología	7
5.3.1 Características del procedimiento de ensayo	7
5.3.2 Preparación de la muestra	7
5.3.3 Protocolo de trabajo	8
5.4 Cálculo y expresión de los resultados	8
5.4.1 Cálculo e informe de los recuentos en placa	9
6 Registro y envío de resultados	9
7 Supervisión a los laboratorios acreditados	9
8 Medidas por Incumplimiento	10
9 ANEXOS	11
9.1 Lista de analista(s) del laboratorio vinculados al diagnóstico	11

1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo del instructivo es dar a conocer los requisitos específicos para la acreditación de laboratorios por parte del SAG para la realización del análisis/ensayo para Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Mediante Técnica PETRIFILM® AOAC Official Method 990.12.

Del mismo modo, en este documento se estipulan instrucciones técnicas que deben cumplir los laboratorios para que obtengan y mantengan tal acreditación.

Este procedimiento aplica para muestras de piel de cuello de ave, las cuales corresponden a muestreos microbiológicos oficiales tomados desde plantas de faenamiento de productos pecuarios de exportación.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Método Oficial 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).
- Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG. Versión vigente.
- Programa de Control Microbiológico de carnes faenadas para exportación. SAG. Versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- NCh 3162/1.Of2008, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Guía para la preparación y producción de medios de cultivo- Parte I: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.
- NCh 3162/2.Of2008, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Guía para la preparación y producción de medios de cultivo- Parte II: Guía práctica para los ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- Resolución Exenta N° 355 de 2005 del Servicio Agrícola y Ganadero o aquella que la reemplace, que "Aprueba Reglamento específico para la acreditación de laboratorios de análisis /ensayos e Instructivos técnicos que indica y deroga Resolución N° 1463/1981".
- Reglamento específico para la Acreditación de Laboratorios Análisis/Ensayo. versión vigente
- Actas Reuniones entre Subdepartamento Laboratorios Pecuarios y Laboratorios habilitados.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá Versión vigente.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Protocolo Oficial SAG	Documentos emitidos por profesionales del SAG: "Protocolo de Toma de Muestra <i>E.coli</i> . Programa de Reducción de Patógenos", "Protocolo de Toma de Muestras y Resultados Laboratorio".
RAM	Recuento de microorganismos Aerobios Mesófilos.
USDA	United States Department Agriculture.
FSIS	Food Safety and Inspection Service.
SAG	Servicio Agrícola y Ganadero.
ISO	International Organization for Standardization
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
SAC	Sistema de Aseguramiento de la Calidad.
MVO	Médico Veterinario Oficial del SAG.
INN	Instituto Nacional de Normalización.

4 REQUISITOS

4.1 Requisitos infraestructura equipos, materiales y reactivos

i) 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.

ii) Equipos, instrumentos y materiales:

- Stomacher.
- Bolsas para Stomacher estériles.
- Material estéril para contener los volúmenes de Diluyente Butterfield's Tamponado necesarios para el análisis.
- Pipetas graduadas estériles y/o micropipetas.
- Probeta estéril.
- Tubos de ensayo estériles.

- Balanza.
- Etiquetas (identificación de muestras) o lápiz marcador indeleble.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Mechero.
- Vortex o Agitador de Tubos.
- Aplicador Petrifilm.
- Estufa de Incubación a 35 °C ± 1°C.
- Contador de colonias o equivalente.

iii) 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.

iv) Estándares

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

4.2 Requisitos de personal

i) Responsable técnico

Según lo dispuesto en el numeral 4.2 del Reglamento Específico para la acreditación de Laboratorios de análisis / ensayo, el Laboratorio debe contar con un **responsable técnico**, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como Laboratorio acreditado, el cual debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Título profesional calificado en el área biológica, de una carrera de al menos ocho semestres académicos, con experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología.
- Haber recibido capacitación en la realización del **Método Oficial AOAC 990.12 para Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Mediante Técnica PETRIFILM®**, en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la acreditación, comprobable mediante certificado correspondiente.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados en este punto.
- 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.

ii) Analista(s):

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

- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de acreditación.
- Haber recibido capacitación en la realización del Método Oficial AOAC 990.12 para Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Mediante Técnica PETRIFILM®, en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la acreditación, comprobable mediante certificado correspondiente.
- 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

- 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 acreditación 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 debe contar con los siguientes documentos:
 - Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la acreditación.
 - Procedimiento e Instructivos Preparación de Medios de Cultivo involucrados en el alcance de la acreditación.
 - 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 acreditación.
 - Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.
 - Programa de Mantenimiento /Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.
 - Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales.

4.4 Medios de verificación de requisitos

El laboratorio solicitante deberá presentar todos los documentos que avalen el Sistema de Aseguramiento de la Calidad, implementado en el laboratorio y que demuestren la acreditación en NCh-ISO 17025. Versión vigente, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos.

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de Acreditación, además de los antecedentes establecidos en el numeral 6.1 del Reglamento para la Acreditación de Laboratorios de Análisis /Ensayo del Servicio Agrícola y Ganadero (<http://www.sag.gob.cl>), los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG en este capítulo.

- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas (flujo de áreas limpias y sucias) y ubicación de equipos.
- 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.
- Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance.
- Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista, según formato (Anexo 1).
- Certificado de título del Responsable Técnico, en original o fotocopia legalizada.
- Certificado de título de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Documentos que acrediten la capacitación tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Instructivos especificados en el numeral 4.3 de este Instructivo.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de Acreditación como en este Instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación por 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.

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 acreditado para este análisis.

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

La toma y envío de muestras deben ser realizada 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 "Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos 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 "Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG". 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 Manual anteriormente mencionado.

5.3 Metodología

5.3.1 Características del procedimiento de ensayo

Las placas 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.

5.3.2 Preparación de la muestra

• Piel cuello de ave

- Asépticamente pesar a lo menos (manteniendo relación 1:10 con el diluyente) 10 ± 0.1 g de muestra representativa dentro de una bolsa estéril Stomacher.
- Agregar 90 ml de Diluyente Butterfield's Tamponado. 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.
- Homogenizar la muestra en equipo Stomacher por 1 minuto a velocidad media.
- Luego depositar 1 ml de esta dilución de acuerdo a lo descrito en punto 5.3.3.

- La siembra en duplicado queda a criterio del laboratorio, para lo cual se debe repetir el procedimiento antes descrito.
- 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 5.3.3.
- En caso de ser necesario, el laboratorio puede realizar más diluciones sucesivas con el objeto de obtener placas con recuentos contables.

5.3.3 Protocolo de trabajo

- Rotular las placas Petrifilm con la identificación de las muestras y la dilución correspondiente.
- Colocar la placa Petrifilm Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos en una superficie plana.
- Levantar el film superior e inocular 1 ml de la dilución decimal apropiada en el centro del film inferior.
- Bajar cuidadosamente el film superior encima de la muestra, evitando la formación de 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.
- Sacar el aplicador y esperar al menos un minuto para permitir que solidifique el gel.
- Por cada dilución existente siembre en una o dos placas.
- Incubar las placas en posición horizontal, cara arriba, en pilas de hasta 20 placas. La incubadora debe estar humidificada
- Incubar las placas Petrifilm Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos por 48 ± 3 hrs a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

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 cm^2 . 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 ocasionará 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.
- Tras la incubación, las placas pueden conservarse, para recuentos posteriores, en congelación a temperaturas bajo o igual a los $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.
- 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. Usar ceros para los demás dígitos hacia la derecha.
- 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).
- 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: $< 10\text{ UFC / g}$ → 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 S.A.G., 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 S.A.G. de acuerdo a lo señalado en los Manuales correspondientes. Cabe señalar, que además debe mantener una copia de los resultados para sus registros.

7 SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS ACREDITADOS

- i) Todo laboratorio acreditado será supervisado mediante visitas de auditorías de seguimiento al menos una vez 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 Acreditado, en un plazo no superior a 10 días hábiles desde la recepción del informe de

auditoria emitido por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias. La renovación de la acreditación 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 Acreditación.

- ii) 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.
- iii) El laboratorio acreditado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales y/o internacionales, en el momento que el Servicio lo requiera.

8 MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO

El Servicio aplicará las sanciones contenidas en el Reglamento específico para la Acreditación de Laboratorios Análisis/Ensayo a aquellos laboratorios acreditados que no cumplan con lo establecido en el citado Reglamento y en el presente instructivo técnico.

Sin perjuicio de lo anterior, y de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del convenio de acreditación, si producto de las acciones de auditoría o supervisión, el Servicio detecta faltas en el desempeño del laboratorio acreditado que afecten negativamente el resultado del programa del SAG asociado, el Servicio podrá instruir al laboratorio acreditado, mediante carta suscrita por el Jefe(a) del Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, un Director(a) Regional o Jefe(a) de Oficina, el cese inmediato de la ejecución de todos o algunos de los análisis que forman parte del alcance de su acreditación hasta que el SAG resuelva en definitiva su caso.

9 ANEXOS

9.1 Lista de analista(s) del laboratorio vinculados al diagnóstico

Nombre Completo	Nº Cédula de Identidad	Firma	Técnica que realiza

.....
Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....

