



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

Código: D-ATR-AAT-031

Versión:02

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

Tabla de Contenidos

Contenido	Página
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 del personal	4
4.1.1 Responsable técnico:	4
4.1.2 Analistas:	5
4.2. Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos soluciones y medios de cultivo	5
4.2.1 Infraestructura	5
4.2.2 Equipos y materiales	6
4.2.3. Reactivos, soluciones y medios de cultivo	6
4.2.4. Estándares	6
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	10
5.3. Metodología	10
5.3.1 Preparación de las muestras	11
5.3.2 Protocolo de trabajo	11
5.3.3 Almacenamiento de las Placas Petrifilm®	12
5.3.4. Selección de las Colonias Características para el Recuento	13
5.4. Cálculo y expresión de los resultados	13
5.4.1. Consenso de criterios para la emisión de resultados	15
6. REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS	15
7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	16
8. OBLIGACIONES	iError! Marcador no definido.
9. FORMULARIO	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 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

- Resolución Exenta N° 90 de 2014, del Servicio Agrícola y Ganadero. Aprueba el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo o la que lo reemplace.
- Resolución N° 3571 de 2020, que aprueba el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros o la que lo reemplace.
- Documentos asociados al Programa de Control Microbiológico Oficial publicados en la página desde la División de Protección Pecuaria.
- Documento General "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación". SAG, versión vigente.
- Instrucciones de 3M para el Producto Petrifilm® EB, 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 426/2 Of. 97. Agua grado reactivo para análisis - Especificaciones - Parte 1: Análisis fisicoquímicos 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.

 <p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AFNOR 3M 01/06-09/97</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-031</p> <p>Versión:02</p>
--	--	--

- ISO 16140-3: 2021 "Microbiology of the food chain –Method validation- Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory.

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- Eliminar la frase
- EB: Enterobacteriaceae
- SAG: Servicio Agrícola y Ganadero (o Servicio).
- 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 General del Sistema nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de análisis/ensayo, el convenio de autorización y el presente instructivo.

4.1 Requisitos del personal

El tercero autorizado, deberá contar con servicios permanentes de profesionales capacitados y competentes para el Recuento de Enterobacteriaceae mediante técnica Petrifilm® AFNOR 3M 01/06-09/97.

4.1.1 Responsable técnico:

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 cargo requiere un subrogante para períodos de ausencia del titular. Este responsable técnico y su subrogante, deben cumplir con los siguientes requerimientos:

- Poseer título profesional universitario otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera profesional del área Biológica. En caso de título obtenido en el extranjero, éste debe estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos (2) años, uno de ellos en análisis en el área de microbiología de alimentos.

- Haber recibido capacitación en la realización del **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, a través de la ejecución de un número de muestras positivas y negativas.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión de la calidad como en la/s metodología/s que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

4.1.2 Analistas:

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.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar, a través de la ejecución de un número de muestras positivas y negativas.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión de la calidad como en las metodologías que se desean autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.

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

4.2.1 Infraestructura

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

4.2.2 Equipos y materiales

- Stomacher.
- Bolsas plásticas resellables, estériles para stomacher y/o Bolsas con filtro de plástico resellables estériles para stomacher.
- Material estéril para contener los volúmenes de Diluyente de Agua Peptonada Tamponada (APT) estéril necesarios para el análisis.
- Pipetas bacteriológicas estériles desechables y/o micropipetas.
- Puntas para micropipetas.
- Probeta estéril.
- Tubos de ensayo estériles.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Balanza digital.
- Etiquetas (identificación de muestras) o lápiz marcador indeleble.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Mechero.
- Vórtex o Agitador de Tubos.
- Aplicador Petrifilm®.
- Estufa de Incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Contador de colonias o equivalente.
- Refrigerador $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
- Congelador para mantención de cepas.
- Autoclave

4.2.3. 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.
- Agua Clase 4.
- Etanol al 70%
- Solución de cloro al 1%.

4.2.4. Estándares

- Se utilizarán como estándares Cepas de colecciones reconocidas, ATCC o equivalente, una cepa de Escherichia coli (ATCC 25922) u otra equivalente, la cual será mantenida y utilizada de acuerdo a

	INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE ENTEROBACTERIACEAE MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM® AFNOR 3M 01/06-09/97	Código: D-ATR-AAT-031 Versión:02
--	---	-------------------------------------

lo señalado ISO 11133, versión vigente. No es posible utilizar cepas bacterianas consideradas exóticas para el país. Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas de colecciones de referencia, serán utilizadas tanto para el control de calidad de los medios de cultivo, como para el control del método de ensayo. Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse como controles positivos y negativos las cepas de referencia recomendadas por el fabricante o aquellos indicados en la ISO 11133, versión vigente

4.3 Requisitos Específicos

- Los laboratorios, deben contar con un sistema de aseguramiento de calidad implementado 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 de la calidad que avale el cumplimiento de NCh-ISO 17025, versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos o por otra entidad Internacional acreditadora para la Norma ISO 17.025, versión vigente, reconocida por la International Organization for Standardization.
- Una vez que el laboratorio solicitante obtenga la autorización de las técnicas por el SAG, se le otorgará un plazo de 2 años para lograr la acreditación de éstas ante el INN o por otra entidad Internacional acreditadora para la Norma ISO 17.025, versión vigente, reconocida por la International Organization for Standardization.
- El Laboratorio deberá indicar su capacidad diagnóstica, señalando el número de muestras que ejecuta por análisis y cantidad de analistas competentes para este alcance.
- El Laboratorio deberá presentar la documentación necesaria que avale la verificación interna efectuada para esta metodología señalada en el presente Instructivo. La verificación debe incluir los parámetros técnicos descritos en la norma ISO 16140-3, versión vigente.
- El Laboratorio debe contar y enviar los siguientes documentos:
 - Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la autorización.
 - Procedimiento e Instructivos 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, reactivos, material de referencia, etc. involucrados en el alcance de la autorización, de acuerdo a lo descrito en la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Programa de Mantenimiento /Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales.
- Demostración de competencia en la metodología a autorizar para todo el personal del alcance. El informe debe incluir número de análisis positivos y negativos realizados por cada analista y Responsable técnico y su subrogante, incluyendo el proceso de confirmación.

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

4.4 Medios de verificación de requisitos

4.4.1. Solicitud de autorización

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

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

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de autorización (F-GF-CGP-PT-068), además de los antecedentes establecidos en 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.

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

Dossier Técnico (obligatorio):

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

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

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

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

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 "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación" emitido por el SAG, última versión vigente.

5.2. Recepción y manejo de la muestra

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

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

5.3. Metodología

Características del procedimiento de ensayo

Las placas de 3M Petrifilm® para el Recuento de Enterobacteriaceae (EB), están elaboradas con un medio de cultivo listo para el uso, que contiene nutrientes modificados de Violet Red Bile Glucose (VRBG), un gelificante soluble en agua fría y un indicador de Tetrastol que facilita la enumeración de colonias.

Las placas 3M Petrifilm® EB se utilizan para la enumeración de Enterobacteriaceae en los alimentos, industrias de bebidas y agua embotellada.

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 30 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 vórtex, 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 vórtex. 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.
- Realice las actividades dentro del gabinete de bioseguridad.
- Para comenzar la inoculación de las placas Petrifilm® EB, éstas deben ser colocadas en una superficie plana.

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

Código: D-ATR-AAT-031

Versión:02

- 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 10^0).
- 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.
- A continuación, proceda con la siembra de un control positivo.
- Para este tipo de matrices incubar las placas Petrifilm® para Recuento de Enterobacteriaceae (EB) durante **24 ± 2 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$** . 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 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ó a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ "; sin embargo, se utilizará la temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.3.3 Almacenamiento de las Placas Petrifilm®.

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

- No se deben utilizar las Placas Petrifilm® que presenten decoloración.

5.3.4. 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® EB.
- 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:

$$N = \frac{\Sigma C}{\dots}$$

$$V \times 1,1 \times d$$

Donde:

ΣC = 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, no se redondea y el valor obtenido se utiliza con un máximo de dos decimales para el siguiente cálculo.
- 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 obtenido, 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**.
- El resultado se debe informar como **UFC/ cm²**.

- Ejemplo:

Recuentos:

Diluciones escogidas: 10⁻²: 90 colonias.

10⁻³: 18 colonias.

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{90 + 18}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{109}{0,011} = 9.909$$

- El resultado obtenido como se indicó anteriormente, el número de microorganismos es **9,90 x 10³ que multiplicado por 5 = 4,95 x 10⁴ UFC/ cm², redondeando es 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 15 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:

$$\underline{1 \times 5}$$

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 10⁻⁰.**

< 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.

5.4.1. Consenso de criterios para la emisión de resultados

- Dos Diluciones consecutivas con recuentos menores a 4 colonias (1 a 3 UFC): Se informa Límite de Detección de la Técnica.
- Dos Diluciones consecutivas con recuentos mayores a 100 colonias: Se informa Muy Numeroso Para Contar (MNPC).
- De las dos Diluciones consecutivas, una se encuentra dentro del rango (15 a 100 colonias) y la otra posee un recuento superior al rango descrito en la técnica: Se toma sólo el recuento que se encuentra dentro de rango, se multiplica por el inverso de la dilución y no se usa fórmula.
- De las dos Diluciones consecutivas, una se encuentra dentro del rango (15 a 100 colonias) y la otra posee un recuento menor al rango descrito en la técnica, pero ≥ 4 : Se toman ambos recuentos y se usa fórmula.
- De las dos Diluciones consecutivas, una se encuentra dentro del rango (15 a 100 colonias) y la otra posee un recuento menor al rango descrito en la técnica, pero menores a 4: Se toma sólo el recuento que se encuentra dentro de rango, se multiplica por el inverso de la dilución y no se usa fórmula.
- De las dos diluciones consecutivas, ambas poseen recuentos fuera de rango (15 a 100 colonias), uno superior y el otro menor, pero ≥ 4 : Se considera el valor ≥ 4 , se multiplica por el inverso a la dilución y no se aplica fórmula.
- Es importante recordar que el resultado obtenido de la lectura de las placas de recuento (usando o no la fórmula de recuento (pág. 14) se debe multiplicar por 5 para entregar el recuento final en **UFC/cm²**.

6. REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS

- Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del SAG, el cual debe contener la firma, timbre y nombre del responsable del laboratorio.

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

Código: D-ATR-AAT-031

Versión:02

- El responsable del laboratorio debe enviar los resultados en el Protocolo Oficial del SAG al MVO, este último, una vez que verifique los datos remitidos en el protocolo, despachará los resultados, de acuerdo a lo señalado en el Documento General "Verificación Microbiológica Oficial en Establecimientos Pecuarios de Exportación".

7. SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

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

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

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

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

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

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

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

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

Código: D-ATR-AAT-031

Versión:02

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

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

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

Los laboratorios deberán participar en programas de ensayos interlaboratorios nacionales y/o internacionales que incorporen el análisis del alcance, al menos una vez al año, cuyos resultados deberán ser remitidos al Departamento RED SAG de Laboratorios.

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


8. OBLIGACIONES

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

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

9. FORMULARIO

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

	Lista De Responsables Técnicos y Analista(s) Del Laboratorio Vinculado Al Análisis	Código: F-ATR-AAT-263 Versión: 01
---	---	--

Identificación del Laboratorio

Razón Social:

RUT:

Nombre completo	Cargo que desempeña. Responsable técnico y subrogante (RT) o analista (A)*	N° Cédula identidad	Firma	Técnicas autorizadas

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

Firma del Representante Legal

Fecha: ____/____/____