



INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE MÉTODO TRADICIONAL DE CULTIVO AOAC OFFICIAL METHOD 966.23.C

Tabla de Contenidos

| <u>Contenido</u> | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| 1 Objetivos y Alcance | 2 |
| 2 Referencias y Documentos Relacionados | 2 |
| 3 Definiciones y Abreviaturas | 2 |
| 4 Requisitos | 3 |
| 4.1 Requisitos infraestructura equipos materiales y reactivos | 3 |
| 4.2 Requisitos de personal | 4 |
| 4.3 Requisitos específicos | 4 |
| 4.4 Medios de verificación de Requisitos | 5 |
| 5 Análisis/Ensayo | 5 |
| 5.1 Captación y envío de la muestra | 5 |
| 5.2 Recepción y manejo de la muestra | 6 |
| 5.3 Metodología | 6 |
| 5.3.1 Preparación de la muestra | 6 |
| 5.3.2 Protocolo de trabajo | 6 |
| 5.4 Cálculo y expresión de los resultados | 7 |
| 6 Registro y envío de resultados | 7 |
| 7 Supervisión a los laboratorios acreditados | 7 |
| 8 Anexo | 8 |



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 Método Tradicional de Cultivo: AOAC Official Method 966.23.C**.

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

- A.O.A.C. Subchapter 2: Chilled, frozen, precooked or prepared foods, and nutmeats, Microbiological Methods, Official Method 966.23.C.
- Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG. Chile 2005.
- Programa de Control Microbiológico de carnes faenadas para exportación. SAG. Chile 2005.
- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025.Of 2001.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of 2002.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- Actas Reuniones entre Subdepartamento Laboratorios Pecuarios y Laboratorios habilitados.
- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá 1999.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Protocolo Oficial

SAG: Documentos emitidos por profesionales del SAG: "Protocolo de Toma de Muestra *E.coli*. 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.Of. 2001.
- Equipamiento básico para realizar las actividades comprendidas en el alcance de la habilitación, de acuerdo a requisitos señalados en NCh-ISO 17025.Of. 2001.
- El Laboratorio debe poseer infraestructura adecuada a un nivel Bioseguridad 2, de acuerdo a Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá 1999.

ii) Equipos:

- 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.

iii) Reactivos, soluciones y medios de cultivo

- Diluyente Butterfield's Tamponado (preparado de acuerdo a lo señalado en Official Method 966.23 A (m)) en cantidad necesaria para procesar las muestras y además dispensada en 9 ml en tubos de ensayo para las diluciones.
- Agar para recuento en placa (Plate Count Agar).

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) 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.
- ii) Contar con personal técnico y/o profesional que debe cumplir el siguiente perfil:
 - 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.Of. 2001.
 - Calificado y capacitado en la realización del método **Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos Mediante Método Tradicional de Cultivo** en el tipo de muestras correspondientes al alcance de la acreditación.
 - Tales capacitaciones y calificaciones deberán ser acreditadas y documentadas mediante los correspondientes certificados.

4.3 Requisitos específicos

- El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de NCh-ISO 17025.Of. 2001.
- 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.



4.4 Medios de verificación de Requisitos

De acuerdo al punto 6.1 del Reglamento Específico para la acreditación de laboratorios de análisis/ensayo, los interesados en acreditarse para este análisis deben presentar junto a su solicitud de acreditación lo siguiente:

- i) Un dossier con los antecedentes generales del laboratorio que se solicitan en dicho reglamento.
- ii) Un dossier para verificar el cumplimiento de los requisitos establecidos en los puntos 4.1 a 4.3 de este instructivo técnico, para lo cual debe adjuntar:
 - Todos los documentos que avalen el SAC implementado en el Laboratorio y/o que demuestren la acreditación en NCh-ISO 17025.Of. 2001.
 - Todos los documentos técnicos relacionados con las metodologías a acreditar.
 - La documentación técnica deberá contemplar como mínimo los documentos señalados en el Anexo N° 1 y deberá ser entregada al momento de realizar la postulación. El Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias podrá solicitar adicionalmente, si lo estima necesario, otros documentos que acrediten esta condición.
 - Listado de identificación de personal técnico y/o profesional, indicando nombre completo, número de cédula de identidad y firma.
 - Título (copia legalizada) y Currículum vitae de cada una de las personas identificadas en el listado anterior.
 - Certificado de capacitación de los analistas de acuerdo al requisito establecido en el capítulo 4.2 ii) de este instructivo.

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. Chile 2005". 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 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} .
 - Homogenizar la muestra en equipo Stomacher por 1 minuto a velocidad media.
 - A partir de la dilución anterior tomar 1 ml y depositarlo en un tubo que contenga 9 ml de Diluyente Butterfield's Tamponado. Esta dilución es denominada 10^{-2} . Con estas 2 diluciones se continúa en el punto 5.3.2.
 - En caso de ser necesario, el laboratorio puede realizar más diluciones sucesivas con el objeto de obtener placas con recuentos contables.

5.3.2 Protocolo de trabajo

- Rotular las placas Petri con la identificación de las muestras y la dilución correspondiente.
- Agitar bien cada dilución y sembrar 1 mL en placa Petri en duplicado.



- Agregar a cada una de las placas 18 a 20 mL de agar para recuento en placa, previamente fundido y enfriado a 42 – 45 °C. No deberá transcurrir más de 15 minutos entre la dilución de la muestra y la siembra en placas.
- Una vez adicionado el agar, mezclar mediante agitación manual con suaves movimientos circulares, por aproximadamente 1 minuto.
- Dejar enfriar, y una vez solidificado el agar, invertir las placas e incubar a 35 °C ± 1 °C por 48 h ± 2 h.

5.4 Cálculo y expresión de los resultados

- Seleccionar las placas que presenten un rango de conteo entre **30 – 300 colonias**.
- Para muestras de **piel de cuello**, como se realizan 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 obtener recuentos dentro del rango 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.
- 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 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. 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 los Manuales correspondientes (ver punto 2). 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.
- ii) Los laboratorios deberán participar en programas de ensayos interlaboratorios nacionales y/o internacionales, 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 ANEXO

Anexo N° 1: Listado de Documentos Técnicos.

- i) Procedimiento / Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la acreditación.
- ii) Procedimiento e Instructivos Preparación de Medios de Cultivo involucrados en el alcance de la acreditación.
- iii) Procedimiento / Instructivo Preparación y Esterilización de Material de Vidrio.
- iv) Procedimiento / Instructivo Eliminación y Descontaminación de Residuos y Materiales.
- v) Procedimiento / Instructivo Aseo y Limpieza de Laboratorios.
- vi) Procedimiento / Instructivo Control Biológico de Esterilidad en Autoclaves.
- vii) Procedimiento / Instructivo de Verificación de Equipos.
- viii) Procedimiento / Instructivo Control Material de Lavado.
- ix) Procedimiento / Instructivo Control de Calidad Interno.
- x) Procedimiento / Instructivo Control de Ambiente.
- xi) Procedimiento / Instructivo Manejo de Cepas Control.
- xii) Lista Maestra de Equipos e Instrumentos de Medición involucrados en el alcance de la acreditación.
- xiii) Instructivo de uso de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.
- xiv) Programa de Mantenimiento / Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.