

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y
DIAGNÓSTICO DE *ESCHERICHIA COLI* EN
PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS DE
EXPORTACIÓN**

Contenido

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | OBJETIVOS Y ALCANCE..... | 4 |
| 2 | REFERENCIAS NORMATIVAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS | 4 |
| 3 | DEFINICIONES Y ABREVIATURAS | 5 |
| 4 | REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN..... | 5 |
| 4.1 | Requisitos de Infraestructura, equipos, materiales y reactivos..... | 5 |
| 4.1.1 | Infraestructura | 5 |
| 4.1.2 | Equipamiento..... | 6 |
| 4.1.3 | Instrumentos y materiales | 7 |
| 4.1.4 | Reactivos, soluciones y medios de cultivo..... | 7 |
| 4.1.5 | Estándares..... | 8 |
| 4.2 | Requisitos de personal de laboratorio | 8 |
| 4.2.1 | Responsable técnico | 8 |
| 4.2.2 | Analistas | 9 |
| 4.3 | Requisitos del personal para muestreo | 9 |
| 4.3.1 | Jefe de equipo | 9 |
| 4.3.2 | Personal de apoyo..... | 9 |
| 4.4 | Requisitos específicos..... | 10 |
| 4.5 | Medios de verificación de requisitos | 10 |
| 5 | DESCRIPCIÓN DEL MUESTREO Y ANALISIS..... | 11 |
| 5.1 | Captación de las muestras | 11 |
| 5.2 | Incorporación como usuario al Sistema Informático SAG | 13 |
| 5.3 | Traslado o envío de muestras..... | 13 |
| 5.4 | Recepción y manejo de la muestra..... | 13 |
| 5.5 | Preparación de la muestra..... | 13 |
| 5.6 | Metodología de diagnóstico..... | 14 |
| 5.6.1 | Método Tradicional de Cultivo basado en Official Method AOAC 966.24 | 14 |
| 5.6.2 | Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14..... | 17 |
| 5.6.3 | Método TEMPO EC AFNOR BIO 12/13-02/05..... | 19 |

| | | |
|-----|---|----|
| 5.7 | Expresión de resultados..... | 21 |
| 5.8 | Variación de la metodología | 21 |
| 6 | REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS | 21 |
| 7 | SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS | 22 |
| 8 | OBLIGACIONES | 22 |
| 9 | FORMULARIOS..... | 23 |

1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este documento es establecer los requisitos y procedimientos que deberán cumplir los(as) interesados(as) que, voluntariamente, postulen ante el SAG, para operar como laboratorio autorizado en la ejecución de la toma de muestras y recuento de *Escherichia coli*, mediante las metodologías de análisis que en este Instructivo se señalan, en productos hortofrutícolas de exportación, ya sea que estas actividades se realicen como parte de los programas de monitoreo que lleve a cabo el SAG y/o para dar respuesta a requerimientos de las autoridades de los países de destino.

El alcance de la autorización corresponderá a la colecta de muestras en:

- Plantas de proceso y embalaje en el producto final.

El procedimiento de diagnóstico a utilizar por el laboratorio autorizado, puede ser uno, o más de uno, de los siguientes métodos:

- Método Tradicional de Cultivo basado en Official Method AOAC 966.24.
- Método Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14.
- Método TEMPO EC AFNOR BIO 12/13-02/05.

Sin perjuicio de lo anterior, en caso de que el Servicio lo requiera, podrá ampliar o modificar las técnicas diagnósticas que forman parte del alcance de esta autorización SAG, frente a lo cual, los laboratorios que deseen mantener su autorización en esta categoría, deberán realizar o modificar dichas técnicas, entregando previamente al SAG toda la documentación correspondiente.

Las actividades relacionadas al proceso de muestreo deberán ser desarrolladas de acuerdo a los métodos y procedimientos específicos establecidos por el SAG en el documento "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación".

Esta autorización se otorgará con carácter nacional.

Las disposiciones del presente instructivo serán aplicables a todas las personas, naturales o jurídicas, que voluntariamente postulen a la autorización referida en este documento.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- International Standard 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.
- Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos, versión vigente. Servicio Agrícola y Ganadero.
- Método Oficial AOAC 991.14: Placa Petrifilm® Recuento de *E. coli* y coliformes en alimentos (método de film seco rehidratable).

- Método Oficial AOAC 966.24: Coliform Group and Escherichia coli in Tree Nut Meats.
- Detección de Bacterias Causantes de Cancrosis desde Frutas Asintomáticas a Campo y en Galpón de Empaque. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Boletín Informativo del Departamento Frutales. Argentina. Citrusmisiones N°31,19p. 2006.
- Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación. Servicio Agrícola y Ganadero.
- TEMPO EC AFNOR BIO 12/13-02/05. Validation study according to the EN ISO 16140 standard. Biomerieux.
- Manual de uso TEMPO EC (*E. coli*) Ref. 80 004. Biomerieux 12597J-es-2013/03.
- Método para la determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli* por la técnica de diluciones en tubo múltiple (NMP). En: Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2009. 2ªed. Facultad de Química, UNAM. México.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| 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. |
| INN: | Instituto Nacional de Normalización. |
| AFNOR: | Asociación Francesa de Normalización |
| Laboratorio Autorizado: | Persona natural o jurídica reconocida y aprobada por el Servicio para ejecutar uno o más análisis/ensayos determinados, en el marco de programas oficiales del SAG, bajo condiciones definidas por el Reglamento específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos y los correspondientes instructivos técnicos. |

4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN

4.1 Requisitos de Infraestructura, equipos, materiales y reactivos

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.

Respecto del muestreo, debe contar con infraestructura destinada a:

- Disposición de equipos o instalaciones.
- Mantención de muestras y resguardo de la integridad de éstas.
- Mantención de registros documentales.

4.1.2 Equipamiento

El laboratorio debe contar con los equipos necesarios, acordes al volumen de muestras, que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar. Deben contar con su certificado de mantención y/o calibración al día, efectuado a lo menos una vez cada 2 años por una empresa pertinente y reconocida en el área, y un programa de mantención y calibración de éstos de acuerdo a las necesidades y requerimientos del Laboratorio.

A continuación se detalla el equipamiento mínimo que se debe considerar:

- Balanza digital entre el rango de los 250g y 2.500g.
- Estufa de cultivo $35^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Agitador de tubos o vortex.
- Autoclave para medios, tampones y material limpio.
- Autoclave para descontaminación.
- Agitador orbital o Stomacher dependiendo del tamaño de la muestra.
- Agitador
- Refrigerador.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Congelador.
- Microscopio.

Adicional para método 966.24:

- Baño de agua termoregulado para coliformes $45,5^{\circ}\text{C}\pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Adicional para método Petrifilm®:

- Aplicador Petrifilm®.
- Contador de colonias o equivalente.

Asimismo, para las labores de muestreo se debe contar con lo siguiente:

- Vehículo adecuado para las labores relacionadas al muestreo.
- Computador.
- Equipo e instalaciones de refrigeración de uso exclusivo.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ (de uso exclusivo para terreno).

4.1.3 Instrumentos y materiales

- Gotarios estériles.
- Pipetas desechables estériles de 1 y 5 ml o micropipetas.
- Recipientes estériles para contener el APT.
- Puntas estériles desechables para micropipetas.
- Guantes desechables estériles.
- Tubos de ensayo estériles.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Bolsas plásticas resellables, estériles.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras.

Adicional para método 966.24:

- Asa desechable de nicrom, o desechable, en aro y asa en punta.
- Placas Petri plásticas desechables.
- Campanas Durham.

Adicional para método Petrifilm®:

Placas Petrifilm 3M para Recuento de *E. coli*.

Respecto del muestreo, deben contar con los instrumentos y materiales que se establecen en el documento "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación". Principalmente un termómetro calibrado o contrastado, en las temperaturas de refrigeración requeridas, para verificar la mantención de la cadena de frío durante el transporte hasta la recepción en el laboratorio.

4.1.4 Reactivos, soluciones y medios de cultivo

El laboratorio debe contar con los reactivos, soluciones y medios de cultivos necesarios, acordes al volumen de muestras (stock suficiente para los análisis de la temporada) y que garanticen el correcto desarrollo de la técnica de análisis a realizar.

A continuación se detallan los reactivos, soluciones y medios de cultivos que se deben considerar como mínimo:

- Agua Peptonada Tamponada. (ISO 6579:2002) Frasco Schott x 500ml o en botella para dispensar, y además dispensada en 9ml en tubos de ensayo para las diluciones.

Adicional para método 966.24:

- Agar Levine con eosina y azul de metileno (LEAM).
- Agar Citrato de Koser.
- Agar Nutritivo.
- Caldo EC.
- Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST). Tubos de ensayo con 10ml y campana Durham.
- Caldo MR – VP.
- Caldo Triptona.
- Reactivo de Kovacs.

- Solución de alfa-naftol 5%.
- Solución de KOH al 40%.
- Agua clase 4.
- Reactivos de Tinción de Gram.
- Etanol 70%.
- Solución de Cloro al 1%.

4.1.5 Estándares

Se utilizarán como estándares cepas ATCC o de colecciones de referencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes*, las cuales serán mantenidas y utilizadas de acuerdo a lo señalado en la Norma Chilena 2726.

Las cepas de trabajo obtenidas a partir de dichas cepas ATCC, serán utilizadas para el control del método de ensayo.

Para el control de calidad de los medios de cultivo, podrán utilizarse las cepas ATCC recomendadas por el fabricante, tanto para controles positivos como controles negativos.

4.2 Requisitos de personal de laboratorio

El postulante debe contar con el siguiente personal para las labores de diagnóstico:

4.2.1 Responsable técnico

Según lo dispuesto en el Reglamento Específico para la autorización 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 autorizado, el cual debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Título profesional del área biológica o afín, de preferencia Ingeniería Agronómica, Biología, Microbiología, Ingeniería en Alimentos, Bioquímica, Biotecnología. Con experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología, específicamente en análisis de alimentos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Haber recibido capacitación en uno o más de los métodos de análisis descritos en el alcance, de acuerdo a la metodología a solicitar autorización. Comprobable mediante el 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 autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar. Deberá presentar un Informe que especifique los análisis realizados por el personal que se está postulando y los criterios escogidos para demostrar competencia.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

4.2.2 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:

- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización, con experiencia laboral comprobable en el área análisis de laboratorio de al menos 6 meses, específicamente en análisis bacteriológico de alimentos. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Haber recibido capacitación y demostrar competencia en uno o más de los métodos de análisis descritos en el alcance, comprobable mediante el 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 autorizar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025, versión vigente.
- Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar. Deberá presentar un Informe que especifique los análisis realizados por el personal que se está postulando y los criterios escogidos para demostrar competencia.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados precedentemente.

4.3 Requisitos del personal para muestreo

El postulante deberá contar con 1 o más equipos de muestreo, los cuales estarán conformados por a lo menos 2 personas que desempeñarán las siguientes funciones:

4.3.1 Jefe de equipo

El Jefe de equipo deberá cumplir con el siguiente perfil:

- Título profesional del área biológica, de preferencia Ingeniería Agronómica, con experiencia laboral comprobable en el área de toma de muestras y análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Debe tener una preparación idónea para la actividad o función a desempeñar, con competencia demostrable mediante certificados de cursos u otros.

4.3.2 Personal de apoyo

El personal de apoyo deberá cumplir con lo siguiente:

- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de autorización. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Debe tener una preparación idónea para la actividad o función a desempeñar, con competencia demostrable mediante certificados de cursos u otros.

4.4 Requisitos específicos

- El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de Norma-ISO 17025, versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN u otra entidad acreditadora, en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos.
- Para aquellos casos en que el laboratorio no tenga, al momento de postular, acreditada una técnica según la ISO 17.025, o no esté en proceso de tramitación, el Servicio podrá otorgar la autorización, siempre y cuando el laboratorio cumpla con los demás requisitos y se comprometa a presentar la solicitud de acreditación de la técnica ante el organismo acreditador dentro de los 6 meses siguientes a la fecha de la Resolución SAG de autorización del laboratorio.
- El Laboratorio debe contar con los siguientes documentos:
 - Procedimiento o 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 o instructivo preparación y esterilización de material de vidrio.
 - Procedimiento o instructivo eliminación y descontaminación de residuos y materiales.
 - Procedimiento o instructivo aseo y limpieza de laboratorios.
 - Procedimiento o instructivo control biológico de esterilidad en autoclaves.
 - Procedimiento o instructivo de verificación de equipos.
 - Procedimiento o instructivo control material de lavado.
 - Procedimiento o instructivo control de calidad interno.
 - Procedimiento o instructivo control de ambiente.
 - Procedimiento o 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 mantención /verificación / calibración de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
 - Instructivo de manejo y protección de datos computacionales.

Respecto de las labores relacionadas con el proceso de muestreo, éstas deberán ser desarrolladas de acuerdo a los métodos y procedimientos específicos establecidos por el SAG en el documento "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación", versión vigente.

4.5 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. Además, si el laboratorio cuenta con la acreditación en NCh-ISO 17025, en alguna de sus áreas de análisis bacteriológicos, deberá presentar la documentación de respaldo.

Para aquellos casos en que el laboratorio no tenga, al momento de postular, acreditada una técnica según la ISO 17.025, o no esté en proceso de tramitación, el Servicio podrá otorgar la autorización, siempre y cuando el laboratorio cumpla con los demás requisitos y se comprometa a presentar la solicitud de acreditación de la técnica ante el organismo acreditador dentro de los 6 meses siguientes a la fecha de la Resolución SAG de Autorización del laboratorio.

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de Autorización, además de los antecedentes establecidos en el numeral 6.1 del Reglamento para la Autorización 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 éstos.
- 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 (titular y subrogante).
- Certificado de título del Responsable Técnico y su subrogante, 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.
- Documentos que acrediten la competencia técnica tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Instructivos especificados en el numeral 4.4 de este Instructivo.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de Autorización 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, a uno o más analistas, o al personal de muestreo, identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica.

5 DESCRIPCIÓN DEL MUESTREO Y ANALISIS

5.1 Captación de las muestras

El muestreo debe ser realizado por personal del laboratorio autorizado que seleccione la planta de proceso y embalaje o exportador, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Servicio.

Al momento de realizar la toma de muestras en las plantas de proceso y embalaje, los muestreadores deberán adoptar las medidas de profilaxis y seguridad personal, así como de desinfección de materiales utilizados para el muestreo. Ver documento "Directrices de Muestreo para Detección de Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación", versión vigente.

La toma y envío de muestras debe ser realizada por el equipo de muestreo del Laboratorio Autorizado, el cual debe adjuntar las muestras a un Protocolo Oficial SAG, en cuyo documento debe señalar al menos la identificación de cada una de las muestras, la especie, la fecha y la hora de la recolección de éstas. El cómo tomar las muestras se indica en el documento "Directrices de Muestreo para Detección de

Peligros Químicos, Físicos y Microbiológicos en Productos Hortofrutícolas de Exportación”, versión vigente.

En el Cuadro N°1 se indican la cantidad de unidades de productos hortofrutícolas a tomar por muestra, las cuales deben ser extraídas desde una caja que sólo puede ser abierta por personal del equipo de muestreo del laboratorio autorizado. Se considera tomar 5 muestras por lote y especie, las cuales deberán ser colocadas en bolsas estériles que resistan el peso y manipulación de la muestra.

Para el caso de racimos de uva de mesa se considera que un racimo corresponde a una fruta grande.

En caso de hortalizas, se considera asimilar a la fruta fresca, la cantidad de unidades a tomar por muestra, de acuerdo a su tamaño. Sin embargo, cuando se trate de hortalizas de hoja, se debe considerar el tomar aproximadamente 500g por muestra.

Nota: cuando se menciona tomar como muestra 500g, tanto para fruta fresca, fruta deshidratada u hortaliza, ésta es una medida aproximada. Para evitar contaminaciones o exceso de manipulación de la muestra, no se pesa en el proceso de toma de muestras.

Cuadro N°1. Tipo y cantidad de muestras a tomar para análisis microbiológico.

| Producto | Observaciones | Cantidad por muestra | Cantidad de muestras |
|--------------------|--|---------------------------------|-----------------------------|
| Fruta fresca | Frutos extra grandes, piña, melón, entre otros. | 1-2 U | 5 |
| | Frutos grandes, Naranjas, Granadas, Uva de mesa, entre otros. | 5-10 U | 5 |
| | Frutos de tamaño medio, ciruelas, damascos, duraznos, entre otros. | 10 U | 5 |
| | Fruta de tamaño pequeño, arándano, frutilla, frambuesa, entre otros. | 500g | 5 |
| Fruta deshidratada | Pasas, entre otros. | 500g | 5 |
| Hortalizas | En caso de unidades compactas, asimilar, la cantidad por muestra, a la fruta fresca, de acuerdo a su tamaño. | 1-2 U 5-10 U 10 U 500g | 5 |
| | En caso de hortalizas de hoja, tales como puerro, perejil, espinaca, entre otros. | 500g | 5 |

5.2 Incorporación como usuario al Sistema Informático SAG

El SAG incorporará al laboratorio autorizado como usuario del Sistema de Información de Sanidad Vegetal (SISVEG) u otro sistema informático que el SAG determine y le proporcionará los nombres de usuarios y las contraseñas correspondientes para la correcta gestión del ingreso de muestras, recepción, seguimiento de las muestras, ingreso de diagnósticos y autorización de los informes de laboratorio.

5.3 Traslado o envío de muestras

El despacho o traslado de la(s) muestra(s) será de responsabilidad del laboratorio autorizado a cargo del muestreo. Sin perjuicio de lo anterior, podrá utilizar los servicios de una empresa de transporte de encomiendas o courier reconocida a nivel nacional y establecida legalmente y que garantice el envío en el tiempo y las condiciones de temperatura adecuados (mantención de cadena de frío).

5.4 Recepción y manejo de la muestra

El ingreso de los datos de la muestra al sistema informático y su posterior recepción en el laboratorio, tanto física como documental, debe ser realizado en un plazo máximo de 1 día hábil, contado desde la fecha de muestreo.

Una vez recepcionada la muestra, el responsable técnico del laboratorio deberá evaluar la aptitud de la muestra para el análisis, considerándose como muestra apta, aquella que presenta temperatura de recepción en un rango entre 2-8°C y que se considera representativa en cantidad y tamaño. Si la muestra presenta condiciones de embalaje inadecuadas, no está separada por especie, no viene en la cantidad indicada en el Cuadro N°1, o no viene con la información adecuada, ésta debe ser rechazada. El mecanismo a seguir en caso de rechazo de la muestra es: ingresar al sistema, incorporar como diagnóstico el resultado NO APTA, indicar en observaciones el motivo de rechazo de la muestra, enviar a autorización y dejar disponible el informe de laboratorio.

Cada una de las 5 muestras tomadas por especie, debe ser considerada como una muestra individual.

El sistema informático del SAG emite, una vez recepcionada la muestra, una Orden de Análisis, la cual es un documento interno del laboratorio. Si el laboratorio utiliza un formato interno distinto, éste no deberá entregar la información de procedencia de la muestra u otra información que pueda influenciar al analista.

Nota: si ocurre que en el proceso de muestreo se toman menos muestras o menor cantidad de unidades o gramaje a la indicada en el Cuadro N°1, se debe dejar constancia y antecedentes que avalen tal situación, de modo que la muestra sea aceptada en el Laboratorio.

5.5 Preparación de la muestra

En primera instancia las muestras se deben pesar en una balanza calibrada, sin abrir la bolsa, y agregar asépticamente Agua Peptonada Tamponada (APT) estéril en una relación 1:1 (1g/ml).

- Todo el contenido de la bolsa se homogeniza en el agitador orbital o Stomacher, dependiendo del volumen de la muestra, por 15-20min.
- Traspasar 30ml de la muestra a un frasco estéril. Esta preparación corresponde a la dilución 10⁰.

- Se deben utilizar frascos diferentes para cada análisis de *Salmonella* spp. y *E. coli*.
- A partir de la muestra del frasco (10^0) realizar diluciones seriadas en APT.
 - **10^{-1}** : a un tubo de ensayo con 9ml de APT estéril, agregar 1ml de la muestra del frasco 10^0 .
 - **10^{-2}** : a un tubo de ensayo con 9ml de APT estéril, agregar 1ml de la muestra del tubo 10^{-1} .
- Para este tipo de análisis no se utilizarán contramuestras.

5.6 Metodología de diagnóstico

5.6.1 Método Tradicional de Cultivo basado en Official Method AOAC 966.24

5.6.1.1 Prueba presuntiva

- A partir de las tres diluciones proceder a la inoculación de los tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST) con campanas Durham invertidas. Inocular:
 - 3 tubos, cada uno con 1ml de la dilución 10^0
 - 3 tubos, cada uno con 1ml de la dilución 10^{-1}
 - 3 tubos, cada uno con 1ml de la dilución 10^{-2}
- Comenzar la inoculación por la dilución más alta 10^{-2} , 10^{-1} y por último 10^0 , utilizando pipetas estériles.
- En total se inoculan 9 tubos de caldo LST por muestra.
- El tiempo entre la preparación de la muestra y su inoculación en un medio no debe ser superior a 15 minutos.
- Agitar suavemente la gradilla para mezclar la muestra con el medio de cultivo.
- Incubar los tubos inoculados a $35\pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 hrs.
- Los tubos se examinan a las 24 ± 2 hrs y son positivos aquellos que tengan presencia de gas, evidenciado por el desplazamiento de líquido en la campana de fermentación Durham (burbuja) o por la efervescencia cuando los tubos se agitan suavemente.
- Reincubar los tubos negativos por 24hrs más y reexaminar la presencia de gas. La presencia de gas significa una **prueba presuntiva** para coliformes. Se **registra como positivo, cualquiera sea la cantidad de gas producido**. Ausencia de gas a las 48hrs significa **prueba presuntiva negativa para coliformes**.
- Si se detecta que el equipo no ha funcionado dentro del rango de temperatura indicado, el análisis debe ser invalidado.
- Registrar el número de tubos positivos de cada dilución.

5.6.1.2 Inoculación en Caldo EC

- Todos los tubos que resulten positivos a las 24 o 48 horas en el Test Presuntivo se transfieren a caldo EC para confirmar *E. coli*.
- Los tubos con caldo EC, previo a ser inoculados, deben ser temperados a $45,5\pm 2^\circ\text{C}$.
- Mezclar por agitación el tubo presuntivo positivo de caldo LST y transferir un inóculo de cada tubo, utilizando un asa desechable en aro, a tubos de fermentación conteniendo caldo EC, con campana Durham invertida. Se debe tener la precaución de enfriar el asa para asegurar que se transfiere un inóculo de cultivo viable.

- Los tubos con caldo EC inoculados se incuban en un baño termoregulado para coliformes (con agitación y cubierta) a $45.5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por intervalos de 24 ± 2 hrs y 48 ± 2 hrs. El nivel de agua del baño termoregulado debe sobrepasar el nivel del caldo dentro de los tubos (aproximadamente 1cm).
- Se debe observar la **formación de gas y turbidez** en los tubos de fermentación de caldo EC a las 24 ± 2 hrs. En caso contrario incubar nuevamente hasta completar las 48 ± 2 hrs.
- Se deben incluir cultivos control en el baño de agua, se usa como control positivo una cepa de *Escherichia coli* y como control negativo una cepa de *Enterobacter aerogenes*. Se debe inocular siempre el control negativo antes del positivo.
- Si los controles positivo y negativo no se comportasen como tal o si se detecta que el equipo no ha funcionado dentro del rango de temperatura indicado, se debe invalidar el análisis.
- La presencia de **gas (efervescencia) y turbidez** en los tubos de fermentación de caldo EC significa una **prueba positiva**. **Ausencia de gas** significa **prueba presuntiva negativa** para *E. coli*.

5.6.1.3 Confirmación para *E. coli*

- De cada tubo de caldo EC que presente formación de gas, transferir una asada a una placa de agar LEAM para obtener colonias aisladas.
- Incubar las placas invertidas 18 a 24 horas a $35^\circ \pm 1^\circ\text{C}$.
- Al término del período de incubación observar las colonias sospechosas, con centro oscuro con o sin brillo metálico. Las colonias descoloridas se descartan del grupo de Coliformes por no ser frecuentemente lactosa fermentadora.
- De cada placa de agar transferir 2 o más colonias aisladas a un tubo de agar nutritivo o agar standard, incubar por 18 a 24 horas a $35^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ para realizar pruebas morfológicas mediante Tinción de Gram y bioquímicas utilizando las reacciones IMViC (Indol, Rojo Metilo, Vogues Proskauer y Citrato, ver Cuadro N°2). Repetir la inoculación en caldo LST para confirmar la producción de gas. Alternativamente se puede realizar un API 20 E o VITEK.

Cuadro N°2 Descripción de las pruebas bioquímicas IMViC

| Prueba | Descripción | Resultado |
|---|--|--|
| Producción de Indol (I) | Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a $35^\circ\text{C}/24 \pm 2$ hrs. Adicionar entre 0,2-0,3ml de reactivo de Kovacs. | La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera prueba positiva. |
| Producción de ácidos mixtos (Rojo de metilo, RM) | Inocular un tubo adicional con caldo RM-VP e incubar a $35^\circ\text{C}/48 \pm 2$ hrs. Adicionar 5 gotas de solución de rojo de metilo. | Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo es una prueba negativa. |
| Producción de metabolitos neutros (Voges-Proskauer, | Inocular un tubo con caldo RM-VP e incubar a $35^\circ\text{C}/48 \pm 2$ hrs. Adicionar 0,6ml de solución VP1 y 0,2ml de solución VP2 y | Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rosa en |

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y
DIAGNÓSTICO DE *ESCHERICHIA COLI* EN PRODUCTOS
HORTOFRUTÍCOLAS DE EXPORTACIÓN**

Código: D-GF-CGP-PT-035
Versión: 01

| | | |
|-------------------------------|---|---|
| VP) | agitar. Dejar reposar durante 10min sin agitar el tubo. | la superficie. |
| Utilización del citrato (C) | Inocular un tubo con caldo citrato de Koser o Simmons un inóculo ligero para evitar turbiedad en el tubo. Incubar a 35°C/96hrs. | El desarrollo de del cultivo que se observa con la turbiedad del medio, se considera una prueba positiva. |

- Todos los cultivos que fermenten la lactosa con producción de gas dentro de 48 hrs a 35±1°C, se observen como bacilos Gram negativos no esporulados y cuyo test IMViC sean + + - - (biotipo 1) o - + - - (biotipo 2), son considerados *E. coli*. (ver Cuadro N°3)

Cuadro N°3 Clasificación de tipos bioquímicos mediante pruebas IMViC.

| I | MR | VP | C | Tipo |
|---|----|----|---|---------------------------------------|
| + | + | - | - | Biotipo 1 <i>E. coli</i> |
| - | + | - | - | Biotipo 2 <i>E. coli</i> |
| + | + | - | + | Típico intermedio |
| - | + | - | + | Atípico intermedio |
| - | - | + | + | Típico <i>Enterobacter aerogenes</i> |
| + | - | + | + | Atípico <i>Enterobacter aerogenes</i> |

5.6.1.4 Cálculo y expresión de resultados

- Calcular el NMP de *E. coli*, basándose en el número de tubos de caldo EC, en que se confirmó su presencia.
- Por lo tanto, mediante la confirmación de tubos positivos (gas y turbidez), se obtiene una serie de tres dígitos, la cual se interpreta de acuerdo a lo señalado en las tablas AOAC 966.24A (Cuadro N°4). A la lectura de esta tabla se le debe aplicar un factor de 0.1 (dividir por 10) dado que los tubos positivos comienzan desde la dilución 10⁻¹ y no 10⁰.
- Se debe informar como NMP/g.
- En caso de no obtener desarrollo en las placas se debe informar de acuerdo al límite de detección de la técnica: <3NMP/g.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL MUESTREO Y DIAGNÓSTICO DE *ESCHERICHIA COLI* EN PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-035
Versión: 01

Cuadro N°4: Coliform Group and Escherichia coli in Tree Nut Meats, Microbiological Method, AOAC Official Method 966.24

Table 966.24A Most probable numbers (MPN) per 1 g test portion, using 3 tubes with each of 0.1, 0.01, and 0.001 g portions

| Positive tubes | | | |
|----------------|------|----------------|-----|----------------|------|----------------|-----|----------------|------|----------------|-----|----------------|------|----------------|-------|
| 0.1 | 0.01 | 0.001 | MPN |
| 0 | 0 | 0 | <3 | 1 | 0 | 0 | 3.6 | 2 | 0 | 0 | 9.1 | 3 | 0 | 0 | 23 |
| 0 | 0 | 1 | 3 | 1 | 0 | 1 | 7.2 | 2 | 0 | 1 | 14 | 3 | 0 | 1 | 39 |
| 0 | 0 | 2 ^a | 6 | 1 | 0 | 2 | 11 | 2 | 0 | 2 | 20 | 3 | 0 | 2 | 64 |
| 0 | 0 | 3 ^a | 9 | 1 | 0 | 3 ^a | 15 | 2 | 0 | 3 ^a | 26 | 3 | 0 | 3 ^a | 95 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 7.3 | 2 | 1 | 0 | 15 | 3 | 1 | 0 | 43 |
| 0 | 1 | 1 | 6.1 | 1 | 1 | 1 | 11 | 2 | 1 | 1 | 20 | 3 | 1 | 1 | 75 |
| 0 | 1 | 2 ^a | 9.2 | 1 | 1 | 2 ^a | 15 | 2 | 1 | 2 | 27 | 3 | 1 | 2 | 120 |
| 0 | 1 | 3 ^a | 12 | 1 | 1 | 3 ^a | 19 | 2 | 1 | 3 ^a | 34 | 3 | 1 | 3 | 160 |
| 0 | 2 | 0 | 6.2 | 1 | 2 | 0 | 11 | 2 | 2 | 0 | 21 | 3 | 2 | 0 | 93 |
| 0 | 2 | 1 ^a | 9.3 | 1 | 2 | 1 | 15 | 2 | 2 | 1 | 28 | 3 | 2 | 1 | 150 |
| 0 | 2 | 2 ^a | 12 | 1 | 2 | 2 ^a | 20 | 2 | 2 | 2 | 35 | 3 | 2 | 2 | 210 |
| 0 | 2 | 3 ^a | 16 | 1 | 2 | 3 ^a | 24 | 2 | 2 | 3 ^a | 42 | 3 | 2 | 3 | 290 |
| 0 | 3 | 0 | 9.4 | 1 | 3 | 0 | 16 | 2 | 3 | 0 | 29 | 3 | 3 | 0 | 240 |
| 0 | 3 | 1 ^a | 13 | 1 | 3 | 1 ^a | 20 | 2 | 3 | 1 | 36 | 3 | 3 | 1 | 460 |
| 0 | 3 | 2 ^a | 16 | 1 | 3 | 2 ^a | 24 | 2 | 3 | 2 ^a | 44 | 3 | 3 | 2 | 1100 |
| 0 | 3 | 3 ^a | 19 | 1 | 3 | 3 ^a | 29 | 2 | 3 | 3 ^a | 53 | 3 | 3 | 3 | >1100 |

* Such highly improbable results suggest that factors were present that interfered with recovery or identification at the lower dilutions. Therefore, the indicated MPN value could be much lower than the true concentration.

5.6.2 Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14.

La placa de 3M Petrifilm® Recuento de *E. coli* y Coliformes (EC), constituyen un sistema listo para usar que contiene elementos nutritivos de Violeta Rojo Bilis (V.R.B.), un agente gelificante soluble en agua, un indicador de la actividad glucuronidasa (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronido) (BCIG) y un indicador de tetrazolio que facilita la enumeración de colonias.

5.6.2.1 Desarrollo del test

- Colocar la placa Petrifilm® para Recuento de *E. coli*, en una superficie plana.
- Levantar el film superior y colocar 1 ml de la muestra (10^0) o su dilución (10^{-1} o 10^{-2}) en el centro del film inferior.
- Bajar con cuidado el film superior sobre la muestra evitando que se formen burbujas de aire.
- Colocar el aplicador con la cara lisa hacia abajo 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 dejar la placa en reposo durante al menos un minuto para que el gel se solidifique.
- Por cada dilución existente siembre en una o dos placas.
- Incubar las placas en posición horizontal, cara arriba, en pilas de hasta 20 placas.
- Incubar las placas Petrifilm® EC para lectura de *E. coli* durante 48 h ± 4 h a 35°C ± 1°C

5.6.2.2 Resultados e interpretación

- El recuento de las placas Petrifilm® EC puede hacerse en un contador estándar de colonias o equivalente. No contar las colonias desarrolladas sobre la zona blanca ya que no están bajo la influencia selectiva del medio. No contar las burbujas presentes debidas a artefactos.
- Para obtener el recuento de *E.coli* confirmados, se deben enumerar las colonias azules a rojo-azuladas asociadas a gas atrapado, independientemente del tamaño o intensidad de color. **Las colonias azules sin gas no se cuentan como *E. coli*.**
- Las colonias rojas y asociadas a burbujas de gas corresponden a Coliformes, por lo tanto no deberán ser consideradas dentro del recuento final de *E.coli*.
- El área de crecimiento circular del Petrifilm® es aproximadamente de 20 cm². Pueden realizarse estimaciones en placas que contengan más de 150 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.
- Las placas Petrifilm® EC con una cantidad de colonias Muy Numerosa para Contar (MNPC) tienen una o más de las siguientes características: muchas colonias pequeñas, muchas burbujas de gas y un oscurecimiento del color del gel, ya que las altas concentraciones de *E.coli* causarán que el área de crecimiento se vuelva azul mientras que altas concentraciones de coliformes (no *E.coli*) causarán que el área de crecimiento se torne de un rojo oscuro.
- Si se requiere, las colonias pueden aislarse para una posterior identificación. Levantar el film superior y seleccionar la colonia del gel. Proceder al análisis siguiendo los métodos estándar.
- Si no es posible realizar el recuento después de terminada la incubación, las placas pueden conservarse en congelación a temperaturas bajo o igual a los - 15°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.

El cálculo del recuento y la expresión de los resultados se realiza de la siguiente forma:

- Seleccionar las placas que presenten un rango de conteo entre **15 – 150 colonias**,
- En caso de realizar diluciones en duplicado se deben promediar el N^o 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.
- Para el Recuento de *E. coli* los valores se informarán de acuerdo al número entero obtenido **sin cambios y sin aproximaciones** (ejemplo: 333, 90, 16 etc.).
- 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:
 - < 1 UFC/g → Muestras en dilución directa (10⁰).

5.6.3 Método TEMPO EC AFNOR BIO 12/13-02/05

- El análisis TEMPO EC está diseñado para utilizarse exclusivamente con el sistema TEMPO para el recuento en 22-27 horas de *Escherichia coli* en productos alimenticios y muestras medioambientales.
- El test TEMPO EC consta de un frasco de medio de cultivo y una tarjeta, que son específicos para este test. El medio de cultivo se inocula con la muestra que se va a analizar. El medio inoculado se transfiere mediante el TEMPO Filler (Llenador TEMPO) a la tarjeta, que contiene 48 pocillos de tres volúmenes diferentes.
- Basada en la actividad β -glucuronidasa, la *Escherichia coli* presente en la tarjeta degrada el sustrato del medio de cultivo durante la incubación y emite una señal que es detectada por el TEMPO Reader (Lector TEMPO). En función del número y tipo de los pocillos positivos, el sistema TEMPO calcula el número de *Escherichia coli* presente en la muestra original según un cálculo basado en el método NMP.

5.6.3.1 Procedimiento

- Retire el número necesario de frascos de medio de cultivo (un frasco por cada muestra que se analice) y espere a que alcancen la temperatura ambiente.
- Regule a 3ml el dosificador que contenga el diluyente secundario y cebe la bomba eliminando los dos primeros volúmenes dosificados.
- Inicie una sesión en la estación de preparación TEMPO.
- Siga las instrucciones de la interfaz de usuario de la estación de preparación: identifique la muestra que va a analizarse, bien introduciendo el identificador con ayuda del teclado o bien usando el lector de códigos de barras de la estación de preparación.
- Reconstituya el medio de cultivo dosificando 3ml de diluyente secundario por frasco con ayuda del dosificador.
- Con una pipeta estéril, aspire 1ml de la dilución 10^{-1} , ver punto 5.5, y transféralo al frasco que contiene el medio de cultivo reconstituido. Homogeneice durante unos 3 segundos utilizando un agitador tipo vórtex. Los 4ml de medio inoculado obtenidos corresponden a una dilución 1/40 de la muestra.
- Retire una tarjeta por cada frasco de medio inoculado, sin tocar la punta del tubo de transferencia. Compruebe que los códigos (colores y abreviaturas) de la tarjeta y del frasco de medio inoculado coinciden.
- Asocie el identificador de la muestra que va a analizarse con los códigos de barras del medio inoculado y la tarjeta correspondiente, con ayuda del lector de códigos de barras de la estación de preparación y siguiendo las instrucciones de la interfaz de usuario de la estación de preparación.
- Ponga el frasco que contiene el medio inoculado en la gradilla de llenado. Inserte la tarjeta en la ranura frente al frasco, introduciendo el tubo de transferencia de la tarjeta dentro del frasco. La gradilla puede alojar 6 frascos con sus tarjetas y permite el llenado simultáneo de 1-6 tarjetas TEMPO.
- Inserte la gradilla en el TEMPO Filler y comience el ciclo de llenado. El medio inoculado se aspira por completo en la tarjeta. Después de completarse el llenado de las tarjetas, el TEMPO Filler corta y sella los tubos de transferencia. Todas estas operaciones se realizan automáticamente y tardan unos 3 minutos.

El ciclo de llenado es el mismo para todos los parámetros y permite llenar al mismo tiempo tarjetas para parámetros diferentes.

- Retire la gradilla de llenado del TEMPO Filler y compruebe visualmente que los frascos estén vacíos. Retire las tarjetas de la gradilla y transfíralas a las gradillas de incubación: inserte las tarjetas en las ranuras, con sus etiquetas orientadas hacia el usuario (hacia el asa de la gradilla). Las tarjetas que tengan que incubarse a la misma temperatura deben agruparse en la misma gradilla. Cada gradilla puede alojar 20 tarjetas. No inserte tarjetas entre las ranuras.
- Deseche los frascos y tubos de transferencia usados en un contenedor apropiado.
- Incube las tarjetas durante 24-27 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, para obtener unos niveles de rendimiento comparables con los de la norma EN ISO 16649-2 (1).

Nota : Como el tiempo mínimo de incubación de las tarjetas autorizado por el software del TEMPO es de 22 horas, el usuario debe prestar particular atención cuando realice los análisis en el ámbito del protocolo certificado NF VALIDATION, para garantizar que se respete el periodo mínimo de 24h de incubación.

Nota: El tiempo de incubación para el test está gestionado por el programa TEMPO Read que integra un intervalo teórico de 15 minutos entre la lectura del código de barras de la tarjeta y el comienzo de la incubación. Si el intervalo real resultase superior a 15 minutos (sin exceder 2 horas), este tiempo extra debe añadirse al tiempo de incubación restante visualizado por el programa TEMPO Read. Sin embargo, la lectura siempre deberá llevarse a cabo dentro del tiempo límite autorizado por el programa de 22-27 horas.

5.6.3.2 Lectura de las tarjetas al final de la incubación

- Inicie una sesión en la estación de lectura.
- Inserte en el lector la gradilla de incubación que contiene las tarjetas que hay que leer. El lector explora el código de barras de cada tarjeta e interpreta los resultados de fluorescencia de los pocillos. Se asocia automáticamente el identificador de la muestra con el tipo de análisis, la dilución y los resultados del recuento. Se puede aplazar la lectura de las tarjetas TEMPO EC almacenándolas a $2-8^\circ\text{C}$ tras su incubación durante un máximo de 48 horas (fuera del ámbito de la certificación AFNOR Validation). En este caso, deje que las tarjetas alcancen temperatura ambiente (aproximadamente 5-15 minutos) antes de introducir las en el lector. Cabe destacar que el resultado obtenido incluirá la anotación "la tarjeta se ha leído demasiado tarde". El usuario puede anotar en el apartado de comentarios que las tarjetas se leyeron después de la refrigeración.
- Edición de los resultados: en la pantalla de la estación de lectura, se asocia el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo o mililitro de producto inicial con el identificador de la muestra, con el parámetro analizado y la fecha del análisis.
- La interfaz de usuario de la estación de lectura permite que los resultados se impriman o se transmitan al sistema de gestión de información del laboratorio (LIMS). El sistema también permite consultar los registros de los resultados obtenidos en los días anteriores.

- Al final del análisis, retire las tarjetas de la gradilla y deséchelas en un receptáculo apropiado.

5.6.3.3 Resultados e interpretación

El número de pocillos positivos obtenidos, en relación con el volumen de los pocillos y la dilución de la muestra, nos proporciona el resultado del recuento en UFC por gramo para la muestra original, mediante las tablas NMP (Número Más Probable).

5.7 Expresión de resultados

- Si las muestras están bajo el nivel de detección de la técnica, se considera negativo, y en las observaciones se indica el límite de detección.
- Si las muestras están sobre el nivel de detección de la técnica, se considera positivo, y en las observaciones se indica la lectura.

5.8 Variación de la metodología

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación, por parte del Servicio, otras metodologías diferentes a las indicadas en este instructivo, las que deben poseer respaldo de validación internacional de acuerdo al Protocolo descrito en la ISO 16140. Una vez evaluadas y aprobadas por el Servicio, en relación a la verificación interna del método efectuada por el laboratorio autorizado y a la competencia de sus analistas, podrán ser implementadas por los laboratorios autorizados.

6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos del análisis de muestras deberán ser ingresados al sistema de información de sanidad vegetal SISVEG u otro establecido, en un plazo máximo de 10 días, desde la fecha de recepción de la(s) muestra(s) por parte del laboratorio autorizado.

Cualquier atraso en el tiempo de respuesta, deberá ser informado por el responsable técnico del laboratorio autorizado, con 2 días hábiles de anticipación a la fecha límite de respuesta, vía correo electrónico, al Supervisor del SAG Lo Aguirre.

La autorización de resultados, en el sistema, será por parte del responsable técnico del laboratorio autorizado, quien los dejará disponibles para el sistema en caso de ser negativos, o en calidad de Reservados, en caso de ser positivos a *Escherichia coli*.

Los informes de resultados con muestras negativas a *Escherichia coli* pueden ser impresos o almacenados como archivo digital y deberán ser informados y enviados al contratante del servicio.

Los resultados positivos solo son referenciales, corresponde a la Oficina SAG, encargada de emitir el Fitosanitario, rechazar o no una partida o lote, dependiendo de los límites máximos solicitados por el país de destino del producto hortofrutícola.

Los informes con muestras positivas a *Escherichia coli* deben ser informados en un plazo máximo de 1 día hábil, vía correo electrónico, al Supervisor del SAG Lo Aguirre. Estos Informes tienen el carácter de confidencial entre el laboratorio autorizado y el SAG y no pueden ser impresos o almacenados como archivo digital, y tampoco pueden ser enviados o informados al contratante del servicio de las muestras. En caso de no respetarse lo anterior, sin previa autorización del Servicio, será considerado como una no conformidad crítica y causal de suspensión inmediata de la autorización. La liberación del Informe, con resultado positivo, solo podrá realizarse cuando el Supervisor del SAG Lo Aguirre así lo instruya, procediendo el responsable Técnico a ingresar al SISVEG u otro sistema informático definido y dejando el diagnóstico disponible.

7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

Todo laboratorio autorizado será supervisado mediante visitas de auditorías de seguimiento al menos una vez al año. El Servicio podrá realizar auditorías adicionales cuando lo estime conveniente. Asimismo, podrá recibir supervisiones del personal del SAG de regiones o del Nivel Central, durante la ejecución del muestreo.

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, 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.

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o el personal del SAG que supervise las actividades de muestreo, detectan faltas en el desempeño del laboratorio autorizado, consideradas como no conformidades críticas, el SAG, de acuerdo con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al laboratorio autorizado, mediante una carta suscrita por el/la Jefa del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o un Director/a Regional o un Jefe/a de Oficina, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización.

El laboratorio autorizado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales y/o internacionales, en el momento que el Servicio lo requiera y poner a disposición la información que corresponda.

8 OBLIGACIONES

Sin perjuicio de las obligaciones estipuladas en el capítulo VII del Reglamento específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos, el laboratorio autorizado deberá cumplir con lo siguiente:

- No podrá ejercer como laboratorio autorizado cuando el representante legal, socios, directores, accionistas, gerentes, responsable técnico o analistas tengan un

interés directo con la actividad para la cual el laboratorio está postulando u otras que determine el Servicio.

- Ante cualquier modificación de infraestructura, personal, procedimientos o equipamiento, el Laboratorio autorizado deberá solicitar su evaluación por escrito a la(el) Jefa(e) Departamento Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros del SAG. Solamente una vez autorizada la modificación, ésta podrá ser realizada.
- En caso de que la metodología de diagnóstico requiera ser actualizada, ya sea por variaciones de la técnica o insumos de la misma, el Servicio informará oficialmente a los laboratorios autorizados, la necesidad de realizar las modificaciones correspondientes, dándose un plazo máximo de 2 meses para ser realizadas.

9 FORMULARIOS

- Formulario de identificación de personal que conforma equipos de muestreo, del Responsable Técnico, Subrogante Técnico, y de analista(s) del laboratorio vinculado(s) al diagnóstico.
- Formulario anexo para el diagnóstico de *Escherichia coli* en productos hortofrutícolas de exportación.

**FORMULARIO DE IDENTIFICACIÓN DEL PERSONAL
VINCULADO AL ANÁLISIS DE *ESCHERICHIA COLI***

Código: F-GF-CGP-PT-152
Versión:01

Identificación del Laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Personal para las labores de muestreo:

| <u>Nombre completo</u> | <u>N° de cédula de identidad</u> | <u>Cargo (Jefe equipo/apoyo)</u> | <u>Firma</u> |
|------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Identificación del analista(s):

| <u>Nombre completo</u> | <u>N° de cédula de identidad</u> | <u>Cargo (Responsable Técnico/Analista)</u> | <u>Firma</u> |
|------------------------|--------------------------------------|---|--------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Firma del postulante o su representante legal

Fecha recepción SAG:.....

Identificación del Laboratorio:

Nombre/razón social:

Cédula de identidad N°/RUT:

Marcar con una X el o los análisis para los cuales solicita la autorización:

| Análisis a los que postula | |
|---|--|
| 1. Método Tradicional de Cultivo basado en Official Method AOAC 966.24. | |
| 2. Método Técnica Petrifilm AOAC Official Method 991.14. | |
| 3. Método TEMPO EC AFNOR BIO 12/13-02/05 | |

Firma del postulante o del representante legal

Fecha: