

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA RECUESTO DE *Escherichia coli* MEDIANTE MÉTODO  
 TRADICIONAL DE CULTIVO  
 AOAC OFFICIAL METHOD 966.24.**

**Tabla de Contenidos**

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1 Objetivos y Alcance .....	2
2 Referencias y Documentos Relacionados .....	2
3 Definiciones y Abreviaturas.....	3
4 Requisitos .....	3
4.1 Requisitos infraestructura, equipos, materiales y reactivos .....	3
4.2 Requisitos de personal.....	4
4.3 Requisitos específicos.....	5
4.4 Medios de verificación de Requisitos .....	6
5 Análisis/Ensayo .....	6
5.1 Captación y envío de la muestra .....	6
5.2 Recepción y manejo de la muestra.....	7
5.3 Metodología .....	7
5.3.1 Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento NO selectivo .....	7
5.3.2 Diluciones.....	8
5.3.3 Prueba presuntiva.....	8
5.3.4 Confirmación de <i>Escherichia coli</i> .....	9
5.4 Cálculo y expresión de los resultados.....	10
6 Registro y envío de resultados .....	11
7 Supervisión a los laboratorios acreditados .....	11
8 Medidas por Incumplimiento .....	12
9 ANEXOS .....	13
9.1 Lista de analista(s) del laboratorio vinculados al diagnóstico .....	13

## **1 OBJETIVOS Y ALCANCE**

El objetivo de este instructivo es dar a conocer los requisitos específicos para la acreditación de laboratorios por parte del SAG para la realización del análisis de ***Escherichia coli* Mediante Método Tradicional de cultivo AOAC Official Method 966.24.**

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, enjuague de carcasa de aves y esponjas de superficie de carcasas, las cuales corresponden a muestreos microbiológicos oficiales tomados desde plantas de faenamiento de productos pecuarios de exportación.

## **2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS**

- AOAC. Subchapter 2: Chilled, frozen, precooked or prepared foods, Coliform Group and *Escherichia coli* in Tree Nut Meats, Microbiological Method, Official Method 966.24.
- AOAC. Chilled, frozen, precooked or prepared foods, and nutmeats, Microbiological Methods, Official Method 966.23.
- Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG. Versión vigente
- Programa de Control Microbiológico de carnes faenadas para exportación. SAG. Versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- Norma Chilena Oficial NCh 2726.Of. 2002.
- Norma Chilena Oficial NCh 426/2 Of. 97.
- NCh 3162/1.Of2008, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Guía para la preparación y producción de medios de cultivo- Parte I: Directrices generales para el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.
- NCh 3162/2. Of 2008, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal- Guía para la preparación y producción de medios de cultivo- Parte II: Guía práctica para los ensayos de rendimiento de los medios de cultivo.
- Resolución Exenta N° 355 de 2005 del Servicio Agrícola y Ganadero o aquella que la reemplace, que "Aprueba Reglamento específico para la acreditación de laboratorios de análisis /ensayos e Instructivos técnicos que indica y deroga Resolución N° 1463/1981".
- Reglamento específico para la Acreditación de Laboratorios Análisis/Ensayo. Versión vigente
- Actas Reuniones entre Subdepartamento Laboratorios Pecuarios y Laboratorios habilitados.

- Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá. Versión vigente.

### **3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS**

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

### **4 REQUISITOS**

#### **4.1 Requisitos infraestructura, equipos, materiales y reactivos**

##### **i) Infraestructura:**

- Infraestructura requerida para llevar a cabo las actividades contempladas en el alcance, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- Equipamiento básico para realizar las actividades comprendidas en el alcance de la habilitación, de acuerdo a requisitos señalados en NCh-ISO 17025. Versión vigente.
- El Laboratorio debe poseer infraestructura adecuada a un nivel Bioseguridad 2, de acuerdo a Laboratory Biosafety Guidelines, Medical Research Council, Canadá (Versión Vigente).

##### **ii) Equipos, instrumentos y materiales:**

- Balanza digital.
- Estufa de cultivo  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Baño de agua termoregulado para coliformes  $45.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ .
- Agitador de tubos o vortex.
- Autoclave.
- Stomacher 80.
- Refrigerador.
- Microscopio.
- Gabinete de Bioseguridad.
- Gotarios estériles.

- Pipetas estériles de 1, 5 y 10 ml.
- Guantes desechables estériles.
- Asa de nicrom de aro y asa en punta.
- Placas Petri plásticas desechables.
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm, 16 x 160mm y 18 x 180 mm.
- Campanas Durham.
- Toalla de papel absorbente.
- Propipeta.
- Bolsas plásticas resellables, estériles.
- Instrumentos estériles para obtener la muestra a pesar: bisturí, tijeras y pinzas.

**iii) Reactivos, soluciones y medios de cultivo:**

- Agar Levine con eosina y azul de metileno (LEAM).
- Agua Peptonada Tamponada. Frasco Schott x 225 ml.
- Agar Citrato de Koser.
- Agar Nutritivo.
- Caldo EC.
- Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST). Tubos de ensayo con 10 ml y Campana Durham.
- Caldo MR – VP.
- Caldo Triptona.
- Diluyente Butterfield's Tamponada.
- 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%.

**iv) Estándares:**

Se utilizarán como estándares Cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterobacter aerogenes* u otras equivalentes, 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 tanto para el control de calidad de los medios de cultivo, como para el control del método de ensayo.

**4.2 Requisitos de personal**

**i) Responsable técnico**

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

- Título profesional calificado en el área biológica, de una carrera de al menos ocho semestres académicos, con experiencia laboral comprobable en el área de análisis de laboratorio de al menos dos años, uno de ellos en el área de bacteriología.

- Haber recibido capacitación en la realización del Análisis de *Escherichia coli* Mediante Método Tradicional de cultivo: AOAC Official Method 966.24, en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la acreditación, comprobable mediante certificado correspondiente.
- De existir un subrogante para este cargo, éste deberá cumplir los mismos requisitos indicados en este punto.
- Calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025. Versión vigente.

#### **ii) Analista(s):**

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

- Contar con un título profesional o técnico compatible con el desarrollo de las funciones asociadas al área de acreditación.
- Haber recibido capacitación en la realización del Análisis de *Escherichia coli* Mediante Método Tradicional de cultivo: AOAC Official Method 966.24, en el tipo de muestras involucradas en el alcance de la acreditación, comprobable mediante certificado correspondiente.
- Calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos, tanto en los aspectos de gestión como en las metodologías que se desean acreditar, cumpliendo lo señalado en los puntos correspondientes de la NCh-ISO 17025. Versión vigente.

#### **4.3 Requisitos específicos**

El Laboratorio debe poseer documentación técnica y de gestión que avale el cumplimiento de NCh-ISO 17025. Versión vigente, para lo cual debe estar acreditado ante el INN en alguna de las áreas relacionadas con análisis bacteriológicos.

Una vez que el laboratorio solicitante obtenga la acreditación de las técnicas por el SAG, se le otorgará un plazo de 2 años para lograr la acreditación de éstas ante el INN.

El Laboratorio debe contar con los siguientes documentos:

- Procedimiento/Instructivo Manejo de Muestras involucrados en el alcance de la acreditación.
- Procedimiento e Instructivos Preparación de Medios de Cultivo involucrados en el alcance de la acreditación.
- Procedimiento /Instructivo Preparación y Esterilización de Material de Vidrio.
- Procedimiento /Instructivo Eliminación y Descontaminación de Residuos y Materiales.
- Procedimiento /Instructivo Aseo y Limpieza de Laboratorios.
- Procedimiento /Instructivo Control Biológico de Esterilidad en Autoclaves.
- Procedimiento /Instructivo de Verificación de Equipos.
- Procedimiento /Instructivo Control Material de Lavado.
- Procedimiento /Instructivo Control de Calidad Interno.

- Procedimiento /Instructivo Control de Ambiente.
- Procedimiento /Instructivo Manejo de Cepas Control.
- Lista Maestra de Equipos e Instrumentos de Medición involucrados en el alcance de la acreditación.
- Instructivos de Uso de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.
- Programa de Mantenimiento /Verificación / Calibración de los equipos involucrados en el alcance de la acreditación.
- Instructivo de Manejo y Protección de datos computacionales

#### **4.4 Medios de verificación de Requisitos**

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

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

- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas (flujo de áreas limpias y sucias) y ubicación de equipos.
- Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención y calibración de estos.
- Lista de materiales, reactivos y Kits.
- Lista de registros técnicos y de calidad utilizados en el alcance.
- Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista, según formato (Anexo 1).
- Certificado de título del Responsable Técnico, en original o fotocopia legalizada.
- Certificado de título de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Documentos que acrediten la capacitación tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de cultivo correspondiente.
- Instructivos especificados en el numeral 4.3 de este Instructivo.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de Acreditación como en este Instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación por los medios que considere idóneos para tal efecto. Con este fin, el SAG podrá someter al Responsable Técnico y a uno o más analistas identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica.

## **5 ANÁLISIS/ENSAYO**

### **5.1 Captación y envío de la muestra**

La captación de las muestras no es una actividad incluida en la competencia del laboratorio acreditado para este análisis.

Para este tipo de análisis no se utilizarán contramuestras.

La toma y envío de muestras deben ser realizada por el Médico Veterinario Oficial del SAG (MVO), el cual debe adjuntar las muestras a un Protocolo Oficial SAG, en cuyo documento debe señalar al menos la identificación de cada una de ellas, el tipo de muestras, la fecha y la hora de la recolección de éstas.

Lo anterior debe realizarse de acuerdo a lo definido en el "Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG" última versión vigente.

## 5.2 Recepción y manejo de la muestra

La recepción y manejo de las muestras en el laboratorio debe realizarse de acuerdo a lo señalado en el "Manual de Procedimientos para Muestreo Microbiológico Oficial en Carnes faenadas en Mataderos de Exportación. SAG". Versión vigente. Cabe señalar, la importancia de verificar los siguientes puntos:

- Temperatura de recepción (rango aceptado: 4 – 8 °C).
- Tiempo entre la toma de muestras y la recepción, ya que DEBEN SER PROCESADAS DENTRO DE LAS 24 HORAS DESDE LA TOMA DE LAS MUESTRAS.
- Integridad de las muestras.
- Cantidad suficiente de muestras para el análisis.
- Identificación adecuada.
- Contenedor con sello SAG intacto.
- Protocolo fuera del contenedor y con los datos requeridos de acuerdo al Manual anteriormente mencionado.

## 5.3 Metodología

### 5.3.1 Preparación de la muestra y pre-enriquecimiento NO selectivo

#### • Método de esponja sobre carcasa (especies detalladas en el Manual del SAG señalado en las referencias)

- La muestra de esponja debe ser recibida dentro de una bolsa plástica resellable estéril, previamente humedecida en 10 ml de Agua Peptonada Tamponada (APT).
- Luego, se deben adicionar 15 mL de APT a la bolsa que contiene la esponja humedecida en 10 ml de APT para llevar a un volumen final de 25 ml. Homogeneizar la muestra apretando el exterior de la bolsa con la mano. Esta preparación corresponde a la dilución  $10^0$ .
- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.
- **Enjuague de carcasa (especies detalladas en el Manual del SAG señalado en las referencias)**
  - Deben utilizarse frascos diferentes para cada análisis de *Salmonella sp* y *E.coli*.
  - La muestra de lavado de carcasa debe ser recibida en un frasco que contenga 30 ml de agua de enjuague. En caso contrario, traspasar 30 ml del enjuague a una bolsa de plástico estéril y comenzar a realizar las diluciones. Esta preparación corresponde a la

dilución  $10^0$ .

- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

- **Piel de cuello de ave**

- El día de procesamiento de las muestras, se coloca la balanza digital en el interior del gabinete de bioseguridad. Luego mediante el uso de utensilios estériles, se pesan  $10 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$  de la muestra a analizar, la cual se introduce al interior de una bolsa plástica estéril de stomacher.
- Adicionar 90 ml de agua de dilución Butterfield's tamponada y homogeneizar por 2 minutos aproximadamente. El homogeneizado de la bolsa corresponde a la dilución  $10^{-1}$
- Continuar como se indica en el punto 5.3.2.

### 5.3.2 Diluciones

Preparar las diluciones decimales (9 ml de diluyente : 1 ml de cada una de las muestras obtenidas en el punto 5.3.1) consecutivas necesarias en agua de dilución Butterfield's tamponada, partiendo de la dilución  $10^{-1}$  para el caso A) (piel de cuello de ave) y de la dilución  $10^0$  para los casos B) (método de la esponja), y C) (lavado de carcasa) como se indica en el punto 5.3.3.

### 5.3.3 Prueba presuntiva

- Una vez realizada las 3 diluciones proceder a la inoculación de los tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptosa (LST) con campanas Durham invertidas. Inocular:

	<b>A)</b>	<b>B) y C)</b>
-	3 tubos, cada uno con 1 mL de la dilución: $10^{-1}$	$10^0$
-	3 tubos, cada uno con 1 mL de la dilución: $10^{-2}$	$10^{-1}$
-	3 tubos, cada uno con 1 mL de la dilución: $10^{-3}$	$10^{-2}$
- Comenzar la inoculación por la dilución más alta, utilizando pipetas estériles. ( $10^{-3}$  o  $10^{-2}$  según corresponda).
- En total se inoculan 9 tubos de caldo LST por muestra.
- Agitar suavemente la gradilla para mezclar la muestra con el medio de cultivo.
- Se deben incluir cultivos controles en la estufa de cultivo. Como control positivo se usa *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes* y como control negativo se usa *Staphylococcus aureus*. Inocular el control negativo antes del positivo.
- Incubar los tubos inoculados a  $35 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  por  $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .
- Los tubos se examinan a las  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  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 24 h más y reexaminar la presencia de gas. La presencia de gas significa una prueba **presuntiva positiva** para coliformes. **Se registra como positivo, cualquiera sea la cantidad de gas producido.** Ausencia de gas a las 48 horas significa **prueba presuntiva negativa** para coliformes.
- Registrar el número de tubos positivos de cada dilución.

### 5.3.4 Confirmación de *Escherichia coli*

#### i) Inoculación en medio selectivo

- Mezclar por agitación cada tubo positivo y transferir de los tubos de caldo LST positivos, una asada (utilizando el asa en aro) a un caldo E.C con campana Durham, temperados previamente  $45,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- Incubar en baño termostático a  $45,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $48 \pm 2\text{ h}$ . El agua del baño termostático debe tener un nivel más alto que el nivel del caldo de cultivo de los tubos (1cm aproximadamente).
- Se deben incluir cultivos controles en el baño termostático. Como control positivo se usa *Escherichia coli* y como control negativo se usa *Enterobacter aerogenes*. Inocular el control negativo antes del positivo.
- Observar la formación de gas y turbidez en los tubos a intervalos de 24 y 48 h. **La presencia de gas y turbidez significa una prueba positiva.** Ausencia de gas a las  $48 \pm 2\text{ h}$  significa **prueba presuntiva negativa** para *E. coli*.

#### ii) Selección de colonias sospechosas

- De cada tubo positivo de caldo E.C, transferir una asada a una placa con agar LEAM. Sembrar por agotamiento, en estrías, de forma de obtener colonias aisladas.
- Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $24 \pm 2\text{ h}$ .
- Al término del período de incubación observar las colonias que presentan un centro oscuro, con o sin brillo metálico. Las colonias descoloridas se descartan del grupo de Coliformes por no ser frecuentemente lactosa fermentadoras.
- De cada placa de agar LEAM transferir 2 o más colonias sospechosas a un tubo de agar nutritivo inclinado. Incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 h y realizar las pruebas morfológicas y bioquímicas (IMVIC) que confirman *E.coli*.

#### iii) Pruebas Confirmatorias de *Escherichia coli*

##### • Tinción de Gram

Realizar esta prueba a partir de cultivos de 18 horas en agar nutritivo. *E. coli* corresponde a bacilos Gram negativos (se observan de color rosado intenso) y no forman esporas.

##### • Pruebas bioquímicas (IMVIC)

###### a) Producción de Indol

Inocular un tubo que contiene 10 ml de caldo triptona e incubar a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2\text{ h}$ . Finalizada la inoculación añadir 0,2 a 0,3 ml de reactivo de Kovacs y agitar.

**Reacción positiva:** formación de un anillo rojo intenso en la superficie del medio.

**Reacción negativa:** color amarillo.

###### b) Rojo de metilo

Reincubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  el cultivo restante del caldo RM-VP por 48 horas adicionales. Luego agregar 5 gotas de indicador de rojo de metilo (0.1 g Rojo

metilo en 300 ml de alcohol 90% y diluir a 500 ml con agua). Observar la coloración de la reacción.

**Reacción positiva:** coloración roja.

**Reacción negativa:** coloración amarilla.

#### c) Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Inocular un tubo con caldo Voges-Proskauer e incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 2$  h. Transferir 1 ml de este cultivo a otro tubo y a este último agregar 0,6 ml de solución de alfa-Naftol al 5 % en alcohol, 0,2 ml de una solución de KOH al 40 % y algunos cristales de creatina. Agitar bien en cada adición y dejar reposar por un tiempo de 2 h.

**Reacción positiva:** coloración rosada.

**Reacción negativa:** coloración parda.

#### d) Prueba en caldo citrato Koser

Inocular suavemente con un asa en aro un tubo de caldo citrato Koser. Incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 96 h. Registrar el crecimiento como positivo o negativo.

**Reacción positiva:** coloración azul.

**Reacción negativa:** coloración verde.

#### e) Prueba de producción de gas para *E. coli*

Inocular un tubo con caldo LST. Usar un mínimo de inóculo para prevenir resultados falsos positivos. Incubar a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $48 \text{ h} \pm 2\text{h}$ . Observar la producción de gas.

**Reacción positiva:** presencia de gas.

**Reacción negativa:** ausencia de gas.

#### f) Pruebas bioquímicas Alternativas

Se podrá utilizar para la confirmación de *E.coli*, Kit de pruebas bioquímicas rápidas, tales como: API 20E de Biomerieux u otras equivalentes reconocidas internacionales.

#### Interpretación de las pruebas de confirmación

Todos los cultivos que fermentan la lactosa con producción de gas a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  dentro de 48 horas y que se observan como bacilos Gram negativos no formador de esporas y cuyas pruebas **IMVIC sean + + - - (Biotipo I)** ó **- + - - (Biotipo II)**, son considerados *E. coli*.

#### 5.4 Cálculo y expresión de los 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 3 dígitos la cual se interpreta de acuerdo a lo señalado en Tabla 966.24A (Coliform Group and *Escherichia coli* in Tree Nut Meats, Microbiological Method, AOAC Official Method 966.24).
- Se debe informar como NMP / g (**piel de cuello**) o NMP / ml (**enjuague de carcasa**).
- Para el caso de muestras de **esponja de bovino y porcino**, se debe dividir el N° obtenido en la tabla mencionada anteriormente por **16 (400 cm<sup>2</sup> de superficie**

**muestreada / 25 ml de dilución inicial)** y se informa como NMP / cm<sup>2</sup>.

- Para muestras de **esponja de ovinos**, se debe realizar el cálculo mencionado anteriormente, dependiendo si se realizan o no duplicados en cada dilución y posteriormente, se debe dividir el número obtenido por **8 (200 cm<sup>2</sup> de superficie muestreada / 25 ml de dilución inicial)**. Se informará como UFC / cm<sup>2</sup>.
- Para el caso de muestras de **esponja de pavo**, se debe dividir el N<sup>o</sup> obtenido en la tabla mencionada anteriormente por **4 (100 cm<sup>2</sup> de superficie muestreada / 25 ml de dilución inicial)**. Se informará como NMP / cm<sup>2</sup>.
- Para el caso de **muestras directas (10<sup>0</sup>)** de esponja o agua de enjuague, a la lectura de la tabla se le debe aplicar un factor de 0,1 (dividir por 10), ya que la tabla comienza desde la dilución 10<sup>-1</sup>.

En caso de no obtener desarrollo en las placas se debe informar de acuerdo al límite de detección de la técnica. Ejemplo:

**E coli Tradicional:**

- a) < 0,3 NMP/ml → Muestras agua de enjuague en diluciones 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>.
- b) < 3 NMP/ ml o NMP/ g → Muestra agua de enjuague o piel de cuello de ave en diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>.
- c) < 0,02 NMP/cm<sup>2</sup> → Muestra de esponja (bovinos y porcinos) en diluciones 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>.
- d) < 0,19 NMP/cm<sup>2</sup> → Muestra de esponja (bovinos y porcinos) en diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>.
- e) < 0,08 NMP/cm<sup>2</sup> → Muestra de esponja pavo en diluciones 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>.
- f) < 0,75 NMP/cm<sup>2</sup> → Muestra de esponja pavo en diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>.
- g) < 0,04 NMP/cm<sup>2</sup> → Muestra de esponja ovino en diluciones 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>.
- h) < 0,38 NMP/cm<sup>2</sup> → Muestra de esponja ovino en diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>.

## **6 REGISTRO Y ENVÍO DE RESULTADOS**

Los resultados deben ser registrados en el Protocolo Oficial del S.A.G., el cual debe contener la firma y nombre del responsable del laboratorio.

El responsable del laboratorio debe enviar los resultados en el Protocolo Oficial del S.A.G. de acuerdo a lo señalado en los Manuales correspondientes. Cabe señalar, que además debe mantener una copia de los resultados para sus registros.

## **7 SUPERVISIÓN A LOS LABORATORIOS ACREDITADOS**

- i) Todo laboratorio acreditado será supervisado mediante visitas de auditorías de seguimiento al menos una vez al año. El Servicio podrá realizar auditorías adicionales cuando lo estime conveniente. La respuesta a las No Conformidades y Observaciones encontradas durante la Auditoría, deberán ser contestadas por el Laboratorio Acreditado, en un plazo no superior a 10 días hábiles desde la recepción del informe de auditoría emitido por el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias. La renovación de la acreditación quedará supeditada a la emisión de un informe, que indique que el Laboratorio Acreditado no posee No Conformidades que afectan el

desempeño, conforme a las especificaciones contenidas en los Instructivos Técnicos y Reglamento Específico de Acreditación.

- ii) Los laboratorios deberán participar en programas de ensayos interlaboratorios nacionales y/o internacionales que incorporen el análisis del alcance, al menos una vez al año, cuyos resultados deberán ser remitidos al Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias.
- iii) El laboratorio acreditado deberá estar dispuesto a recibir auditorías nacionales y/o internacionales, en el momento que el Servicio lo requiera.

## **8 MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO**

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

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

**9 ANEXOS**

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

Nombre Completo	Nº Cédula de Identidad	Firma	Técnica que realiza

.....  
Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....

