



**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO
DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS
ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN**

Código: D-GF-CGP-PT-016

Versión:01

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE
VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES
DE EXPORTACIÓN**

TABLA DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁGINA
1 OBJETIVOS Y ALCANCE	3
2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS.....	3
3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	4
4 REQUISITOS	4
4.1 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos.	4
4.2 Requisitos de personal	6
4.3 Requisitos específicos.	7
4.4 Medios de verificación de requisitos.	7
5 ANÁLISIS/ENSAYO	8
5.1 Condiciones previas	8
5.2 Captación y Envío.....	8
5.3 Recepción de la muestra y manejo de la muestra/contramuestra	10
5.4 Metodología.....	11
6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS	13
7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	14
8 OBLIGACIONES	15
9 ANEXOS	15

1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este documento es establecer los requisitos que deberán cumplir los/as interesados/as que voluntariamente postulen ante el SAG, para operar como laboratorio autorizado en la ejecución del diagnóstico de virus fitopatógenos en tejido vegetal de bulbos ornamentales de exportación, esto es bulbos madres y plantas o partes de plantas, en el marco del Programa de Material de Propagación de Exportación.

El alcance del presente instructivo, está dirigido al diagnóstico de los siguientes virus fitopatógenos:

1. Lily virus X o LVX
2. Lily mottle virus o LMoV
3. Arabis mosaic virus o ArMV
4. Tomato ringspot virus o ToRSV
5. Tobacco ringspot virus o TRSV
6. Lily symptomless virus o LSV
7. Tulip breaking virus o TBV

Asimismo, este documento entrega las directrices para que estos laboratorios, una vez que obtengan la autorización del SAG, realicen el diagnóstico de los virus fitopatógenos anteriormente señalados, según la técnica analítica que se detalla.

Sin perjuicio de lo anterior, en caso de que el Servicio lo requiera, podrá ampliar las especies de hospederos y/o virus y/o 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 postular a la ampliación de su autorización de acuerdo al procedimiento descrito en el numeral 13 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Resolución Exenta N° 529, de fecha 26 de enero del 2012, del Director Nacional del SAG Servicio Agrícola y Ganadero, que norma el Sistema Nacional de Autorización de Terceros.
- Resolución Exenta N° 90, de fecha 6 de enero de 2014, que aprueba el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos, del Servicio Agrícola y Ganadero.

3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

Analista	Persona designada por el laboratorio autorizado, para desempeñarse en temas técnicos asociados a su actividad y que cumple con el perfil definido por el SAG para este cargo.
BPL o Buenas Prácticas de Laboratorio	Conjunto de normas referente a la organización y condiciones sobre las que los trabajos de laboratorios son planificados, realizados, monitoreados, registrados e informados.
ELISA o Enzyme Linked Inmuno Assay	Inmuno análisis ligado a enzimas
Laboratorio Autorizado	Laboratorio autorizado por el Servicio para ejecutar uno o más análisis/ensayos determinados, en apoyo a los programas oficiales del SAG, bajo condiciones definidas por el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos y los correspondientes instructivos técnicos.
Material de Referencia	Material, sustancia u organismo que provee trazabilidad esencial y se usa para demostrar la exactitud de los resultados, calibraciones de equipos y métodos, para monitorear el funcionamiento del laboratorio, para validar métodos y que permite la comparación de métodos, usándolos como estándares transferibles.
Virus fitopatógeno	Agente virulento que es capaz de infectar una planta.
Responsable Técnico	Persona designada por un laboratorio autorizado para actuar como contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad y que cumple con el perfil definido por el SAG para este cargo.
Servicio/SAG	Servicio Agrícola y Ganadero.
Síntoma	Expresión externa o interna de alteraciones morfológicas por la acción de un agente causal en una planta enferma.
SISVEG	Sistema de Información de Sanidad Vegetal.

4 REQUISITOS

4.1 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos.

4.1.1 REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA

El laboratorio debe contar con una infraestructura que garantice el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar, disponiendo de áreas con suficiente espacio para ejecutar en forma óptima las actividades.

En todos los casos debe existir una separación efectiva entre las áreas vecinas, en donde se efectúan actividades incompatibles, ya sea mediante paneles o piezas separadas, para evitar contaminación cruzada.

Las superficies de muros, cielos, pisos y mesones deben ser lisas, de fácil limpieza e impermeables.

El laboratorio debe contar, al menos, con salas separadas de preparación de muestras, lavado y laboratorio de serología.

El laboratorio debe contar con una cámara de frío, con rangos de temperatura entre 2°C y 6°C, en donde se almacenarán las muestras de bulbos previo y posterior a su análisis.

4.1.2 REQUISITOS DE 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.

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

- Sensor de temperatura que permita verificar la temperatura de las muestras al momento del ingreso, el rango de trabajo debe ser de 0 a 30°C, con una división de 1°C y un error máximo de 0,5°C.
- Balanza de precisión de 1 a 500 gramos con una resolución de 0,1 gramo.
- Balanza analítica de 0 a 200 gramos resolución 0,0001 gramos
- Estufa de incubación que alcance una temperatura de 37°C, con un error máximo de $\pm 1^\circ\text{C}$.
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 μl , o equivalente.
- Peachímetro.
- Plato térmico con agitador magnético.
- Freezer que alcance temperaturas de -20°C o menores.
- Refrigerador que alcance una temperatura de $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$.
- Lector ELISA con sistema de impresión de registros que permita trazabilidad de los resultados (fecha y hora).

4.1.3 REQUISITOS DE MATERIALES Y REACTIVOS

El laboratorio debe contar con los materiales, reactivos necesarios y material de referencia 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.

Deberá contar con todos los kit de diagnósticos necesarios para analizar todos los virus indicados en el alcance de la presente autorización.

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-GF-CGP-PT-016 Versión:01
--	---	---------------------------------------

A continuación se detallan algunos de los materiales y reactivos que se deben considerar como mínimo:

- Kit de diagnóstico de acuerdo a los virus indicados en el alcance:
 - Lily virus X o LVX : BQ Support
 - Lily mottle virus o LMoV : BQ Support
 - Arabis mosaic virus o ArMV : Agdia, Bioreba, Loewe, Adgen-Neogen
 - Tomato ringspot virus o ToRSV : Agdia, Bioreba
 - Tobacco ringspot virus o TRSV : Agdia, Bioreba.
 - Lily symptomless virus o LSV : BQ Support; Adgen-Neogen; Agdia
 - Tulip breaking virus o TBV : BQ Support
- Controles positivos y negativos de los virus del alcance.
- Placas ELISA Nunc Maxisorp.
- Puntas de micropipetas.
- Bolsas de extracción.
- Tampón de extracción o reactivos necesarios para preparación.
- Tampón de lavado o reactivos necesarios para preparación.
- Tampón conjugado o reactivos para preparación.
- Tampón sustrato o reactivos para preparación.
- Sustrato p-nitrofenilfosfato.

4.2 Requisitos de personal

El laboratorio debe contar con el siguiente personal:

4.2.1 RESPONSABLE TÉCNICO

El laboratorio deberá designar un/a responsable técnico, quien será la contraparte ante el SAG en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado y tendrá responsabilidad directa en el correcto desempeño de las actividades que el laboratorio autorizado realice en el ámbito de su autorización. Asimismo, deberá cumplir con el siguiente perfil:

- Poseer título profesional otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera de las ciencias silvoagrícolas, bioquímicas, biotecnológicas o biológicas. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Experiencia laboral en el área de laboratorios de al menos dos (2) años.
- Tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 6 meses) comprobable en diagnósticos de virología y técnicas serológicas.

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-GF-CGP-PT-016 Versión:01
--	---	---------------------------------------

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 título profesional o técnico o ser egresado, de una carrera correspondiente al área biológica o afín, impartida por una entidad de enseñanza superior reconocida por el Estado. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 6 meses) comprobable en diagnósticos de virología y técnicas serológicas.

El laboratorio, previendo una eventual ausencia del responsable técnico o del o los analistas, podrá postular a otras personas para que actúen en ausencia del o los titulares, en calidad de subrogante. En tal caso, el laboratorio deberá solicitarlo por escrito, presentando al Servicio la documentación que demuestre que ese personal cumple con el perfil para desempeñar el cargo.

4.3 Requisitos Específicos.

El laboratorio debe contar con un sistema de gestión de calidad o aseguramiento de calidad implementado basado en buenas prácticas de laboratorio. En este sentido debe contar con un manual de procedimientos que describa en forma detallada el proceso de análisis, el manejo de los controles, el manejo de las contramuestras, la preparación de las soluciones y la eliminación de residuos. Sin perjuicio de lo anterior, el laboratorio también deberá contar con los procedimientos que consideren la metodología indicada en el numeral 5.4 de este instructivo.

El laboratorio deberá contar con timbres para ser utilizados en el marco de la autorización, que consignen el nombre del laboratorio.

4.4 Medios de verificación de requisitos.

De acuerdo a lo dispuesto en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos, los interesados en autorizarse para realizar el diagnóstico de virus en tejido vegetal de bulbos ornamentales de exportación, deben presentar **junto a la solicitud de autorización** los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG:

1. Los antecedentes generales del laboratorio que se establecen en el numeral 6.1 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
2. Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos.
3. Lista de equipos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio y capacidad cuando corresponda.
4. Lista de materiales, reactivos y material de referencia.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-016

Versión:01

5. Formulario de identificación del responsable técnico, según formato establecido en el formulario F-GF-CGP-PT-09 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
6. Certificado de título del responsable técnico identificado en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
7. Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista (F-GF-CGP-PT-083).
8. Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificados en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
9. Documentos que acrediten la competencia técnica y/o experiencia laboral del/la responsable técnico en las áreas de virología y serológicas, técnicas moleculares y/o pruebas biológicas, según corresponda.
10. Documentos que acrediten la competencia técnica y/o experiencia laboral de los/las analistas en las áreas de virología y serológicas, técnicas moleculares y/o pruebas biológicas, según corresponda.
11. Manual de procedimientos de acuerdo a lo señalado en el numeral 4.3 de este instructivo.
12. Manual de procedimiento de la metodología.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el reglamento específico como en este instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación o por los medios que considere idóneos para tal efecto. Asimismo, el SAG podrá solicitar al postulante la ejecución de la técnica por parte del responsable técnico o de uno o más analistas del laboratorio.

5 ANÁLISIS/ENSAYO

5.1 Condiciones previas

La persona responsable del material vegetal al momento de realizar su inscripción o a más tardar el 30 de septiembre de cada año, deberá declarar al Servicio el nombre del laboratorio autorizado al que se deben enviar las muestras obtenidas, utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-084 de este instructivo, y deberá ser firmado tanto por la persona responsable del material vegetal como por el laboratorio autorizado. Esta declaración deberá ser enviada a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra por algún medio escrito (vía correo electrónico, fax u otro), con copia al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio.

5.2 Captación y Envío

El muestreo de bulbos madres podrá ser realizado, tanto por un funcionario SAG como por personal de la empresa productora bajo supervisión del Servicio, para lo cual se captarán 200 bulbos desde cada lote de plantación. Por el contrario, cuando el muestreo se realice desde el lugar de producción, éste sólo podrá ser realizado por funcionarios SAG, e irá dirigido a captar plantas o partes de plantas que presenten sintomatología asociada a virus. En ambos casos se deberán seguir los lineamientos dictados por el Subdepartamento Certificación Fitosanitaria.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-016

Versión:01

Cada muestra estará identificada con una "etiqueta de identificación de muestras" (código de barras con la fecha, número de folio y correlativo), generada por el Sistema de Información Vegetal (SISVEG) y acompañada por la hoja de envío correspondiente, que señalará el nombre de la empresa, el código del lote de plantación y, de corresponder, el código asignado por mercado (Código MAFF, Código AQSIQ, etc.). Asimismo, cuando el mercado de destino solicite el análisis de Tobacco rattle virus (TRV) en bulbos madres, el funcionario SAG deberá consignar tal situación en la hoja de envío que acompaña a la muestra, con la finalidad que el laboratorio autorizado, una vez recepcionada la muestra, separe una escama desde cada bulbo de la muestra, hasta completar las 200 escamas, para posteriormente enviarlas al laboratorio SAG para su análisis.

El despacho de las muestras será de responsabilidad del personal de la oficina SAG sectorial bajo cuya jurisdicción se encuentre el material vegetal a analizar. Sin perjuicio de lo anterior, se utilizarán los servicios de una empresa de transporte de encomiendas o courier reconocida a nivel nacional y establecida legalmente, que garantice el envío en el tiempo y las condiciones de temperatura adecuados (mantención de cadena de frío de ser necesario), según los requerimientos específicos establecidos en el presente instructivo.

Los costos asociados al despacho de la encomienda, serán de cargo del laboratorio autorizado escogido para analizar las muestras, por lo que el envío se efectuará, según sea el caso, de la siguiente manera:

- i) Cargado a un número de cuenta, previamente informado por el laboratorio autorizado a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra, con copia al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-085 de este instructivo, en caso de existir un convenio entre el laboratorio autorizado y una empresa de transporte de encomiendas, o,
- ii) Por cobrar al laboratorio autorizado, cuando al momento de efectuar el envío, el laboratorio de destino no posee, o el Servicio no esté en conocimiento de la existencia del convenio antes descrito. En este caso, el SAG se reserva el derecho de envío a través de una empresa de transporte de encomiendas que asegure adecuadas condiciones de traslado, siendo obligatoriedad por parte del laboratorio, recepcionar la(s) muestra(s).

La Oficina SAG correspondiente, creará en el Sistema computacional SISVEG un protocolo por cada lote de bulbos madre muestreado, el cual incluirá un folio por muestra del lote y un correlativo por cada submuestra. En el caso de muestras captadas en campo, se generará un folio por lote de plantación y un número correlativo por cada muestra tomada. La muestra será identificada con un código de barras el cual indica el año-folio-correlativo. Con estos datos el laboratorio podrá acceder al Folio a través de SISVEG (previa asignación de cuenta y clave de usuario) y podrá ver los datos de la muestra y los virus fitopatógenos solicitados. El funcionario SAG, al momento de despachar las muestras al laboratorio autorizado, adjuntará una Hoja de Envío en la cual se indicará el detalle de las muestras, señalando el lote de plantación o código asignado según el mercado, los folios, los correlativos y el nombre de la empresa productora de bulbos.

 <p>SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile</p>	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-GF-CGP-PT-016 Versión:01
--	---	---------------------------------------

5.3 Recepción de la muestra y manejo de la muestra/contramuestra

5.3.1 RECEPCIÓN DE LA MUESTRA

El laboratorio autorizado deberá informar por escrito (vía correo electrónico, fax u otro) al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, la recepción de muestras asociadas al alcance de la autorización ante el SAG. Este aviso deberá ser realizado el mismo día de recepción del primer protocolo de toma de muestras, utilizando el formulario F-GF-CGP-PT-086 de este instructivo.

Toda muestra debe ingresar al laboratorio autorizado con su correspondiente "etiqueta de identificación de muestras" (código de barras con la fecha, número de folio y correlativo), generada por el Sistema de Información Vegetal (SISVEG) y acompañada por la hoja de envío correspondiente.

El laboratorio deberá comprobar al momento del ingreso de la muestra, que ésta se encuentre en condiciones adecuadas de embalaje y que el tiempo entre el despacho y la recepción en el laboratorio sea menor o igual a 72 horas. Además, debe confirmar que la información contenida en el formulario oficial esté completa y que el número de folio y correlativo señalado, coincidan con la rotulación de la etiqueta de identificación de cada una de las muestras, así como también con la cantidad de muestras recibidas. Una vez verificado lo anterior, el recepcionista del laboratorio, dejará constancia de la recepción de la o las muestras, mediante timbre y firma del formulario oficial, indicando además la fecha y hora de recepción, quedándose el laboratorio autorizado con una copia de este formulario y del documento o guía de despacho de la empresa de encomiendas.

Posteriormente, el responsable técnico deberá evaluar la aptitud de las muestras para el análisis, considerándose como muestra apta, aquella que no presenta signos evidentes de deshidratación y/o descomposición, además de ser representativa en cantidad y tamaño.

Si la muestra presenta condiciones de embalaje inadecuadas o no apta para análisis, debe ser rechazada.

En caso que las muestras no vengan acompañadas por todos sus documentos, que la información esté incompleta, no coincida y/o en caso de rechazo de muestras, se debe avisar en forma escrita de tal situación (vía correo electrónico u otro) y de manera simultánea, tanto a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra (supervisor o inspector muestreador), como al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio. En esta comunicación se deberá indicar el problema, identificando el N° de Folio del Protocolo, el o los números correlativos de las muestras (esto dentro de un plazo máximo de un (1) día corrido, contado desde la recepción de la muestra por parte del laboratorio autorizado) y solicitar las medidas a seguir (corrección del problema o envío de nueva muestra, según corresponda).

Una vez que el laboratorio autorizado ha verificado lo anterior y considerado que la(s) muestra(s) son apta(s) para su análisis, debe aceptarlas recepcionándolas en el sistema computacional SISVEG. Una vez realizada la recepción se podrá imprimir la "Orden de Análisis" SISVEG donde se indican los virus a analizar.

Las muestras deberán ser conservadas en una cámara de frío, hasta el momento del análisis, a una temperatura de $6\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

5.3.2 MANEJO DE LA CONTRAMUESTRA

El Laboratorio deberá mantener al menos 2 tubos (1,5 ó 2 ml) con tejido de la muestra macerado en tampón de extracción por al menos 6 meses luego del análisis. Esta conservación deberá realizarse a una temperatura de $-20 \pm 2\text{ °C}$. Además para las muestras positivas se deberá conservar contramuestras sin macerar entre 4 a 6 °C durante al menos 3 meses posteriores a la recepción de la muestra.

5.4 Metodología.

Para el caso de los análisis en bulbos madres, previo a su ejecución y considerando que las muestras se componen de 200 bulbos por cada lote, el laboratorio autorizado deberá extraer una escama desde la sección interior de cada uno de los 200 bulbos. Estas escamas, a la vez, se subagruparán de a tres, componiendo las submuestras que serán maceradas en la base de extracción.

En el caso de los análisis para muestras vegetales captadas en campo, la muestra estará compuesta de plantas o follaje

La metodología de análisis a utilizar será DAS (Double antibody Sándwich) - ELISA (Enzimed-linked Inmuno Assay) siguiendo las especificaciones de diluciones y tiempos de incubación según indique el fabricante de cada tipo de Kit.

Las muestras serán analizadas para todos los virus solicitados en la "Orden de análisis SISVEG".

Cada muestra se dispondrá en la placa ELISA en duplicado, siguiendo un diseño estándar para el laboratorio, sin embargo se debe tener en cuenta que no pueden situarse en forma consecutiva, ya sea en la fila como en la columna de la placa.

Se deberán incluir en cada placa controles positivos (al menos 2 celdas), controles negativos (al menos 3 celdas) y celdas blanco (al menos 2 celdas). Los controles positivos y negativos podrán corresponder a controles proporcionados por la empresa proveedora del kit de diagnóstico o muestras propias que estén infectadas por el o los virus a analizar, o libre de virus y que estén debidamente almacenadas y validadas en su condición. Esta validación debe ser realizada en forma previa al inicio de temporada y antes del proceso de muestras oficiales, y puede realizarse realizando un test en los cuales se incluyan controles comerciales y las muestras postulantes a control. Las celdas blanco serán sensibilizadas con anticuerpos y se les adicionara buffer de extracción sin muestra aplicando todos los pasos del ELISA.

Los detalles de la preparación de las muestras así como el uso de tampones de extracción, diluciones de anticuerpos, tampones conjugados, tiempos de incubación, entre otros, deberán realizarse según las instrucciones del fabricante del Kit.

Cuando corresponda realizar más de un análisis por muestra, se deberá respetar el proceso de preparación de muestras de cada kit utilizado.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-016

Versión:01

Debido a que todos los kit autorizados, utilizan el sustrato P-Nitrofenilfosfato, las placas deberán ser leídas en un Lector ELISA de acuerdo a la absorbancia de cada celda a una longitud de onda de 405 nm y los datos obtenidos deberán adjuntarse al Mapa de las muestras.

Eventualmente, el Servicio podrá establecer modificaciones a las pautas de análisis, para lo cual el laboratorio será informado e invitado a participar de capacitaciones específicas. Los acuerdos técnicos serán agregados como apéndices o anexos a este instructivo.

Las muestras deben ser analizadas en un plazo no superior a 8 días corridos desde la fecha de recepción en el laboratorio hasta la emisión del informe fitosanitario con los resultados en el sistema SISVEG

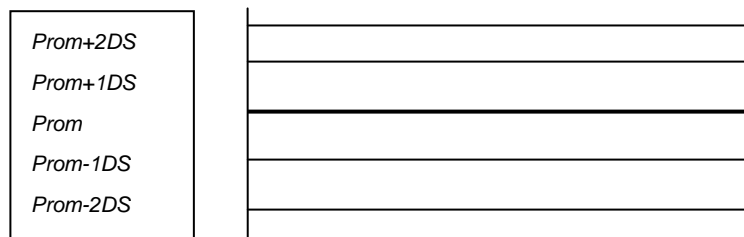
No obstante lo anterior, los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, otras metodologías o variantes de las indicadas en este instructivo, las que una vez aprobadas podrán ser implementadas por los laboratorios autorizados.

5.4.1 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El laboratorio deberá definir "Cartas Control" para sus materiales de referencia (controles positivos y negativos) los cuales deberán definirse previo a cada temporada o a cada nuevo kit utilizado o material de referencia. Con estas cartas control se definirán los criterios de aceptación o rechazo de cada placa analizada.

La metodología será la siguiente:

- Se definirán valores promedios esperados para los materiales de referencia. Estos valores se pueden obtener a través del análisis de estos materiales, empleando el kit seleccionado para la temporada, y agregando las posibles variables a actuar en los valores obtenidos, como por ejemplo realizar el análisis con distintos operarios. Con estos valores se definirá un valor promedio y las correspondientes desviaciones estándar.
- Con estos valores se procederá a realizar un gráfico o Carta Control en la cual a través de líneas perpendiculares se definirán distintas áreas.



- Las líneas se definirán como:
 - Línea central: valor promedio.
 - 2 líneas superiores: la primera como el valor promedio más una vez la desviación estándar, y la segunda corresponde al valor promedio más dos veces la desviación estándar.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-016

Versión:01

- 2 líneas inferiores: la primera como el valor promedio menos una vez la desviación estándar, y la segunda corresponde al valor promedio menos dos veces la desviación estándar.
- En este cuadro control se graficarán todos los valores obtenidos para cada Kit y sus respectivos materiales de referencia, los cuales se obtienen de los análisis realizados para las muestras enviadas por los inspectores SAG.
- Cuando 2 puntos del gráfico en forma consecutiva caigan fuera de la zona de Prom+2DS para los controles negativos y Prom-2DS para los controles positivos, se deberá dar aviso al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio a través de correo electrónico, y se deberá enviar un informe de revisión del sistema, en el cual se indique las posibles causales de esta desviación de valores de los materiales de referencia. Esta comunicación deberá realizarse al día siguiente de obtenido el valor fuera de rango.

5.4.2 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Una muestra será considerada positiva cuando el promedio de los valores obtenidos en las 2 celdas, sea mayor al doble del promedio de los valores obtenidos en las celdas de los controles negativos. Sin embargo cuando en forma individual 1 celda tenga el valor considerado positivo y la otra celda arroje un valor negativo, la muestra deberá ser repetida a partir de uno de los tubos almacenados como contramuestra. Si la situación se vuelve a repetir se deberá dar aviso vía correo electrónico al Encargado de Supervisión de ese laboratorio, para evaluar las medidas a tomar.

5.4.3 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

En el mapa correspondiente se indicará el o los correlativos positivos obtenidos en una determinada placa para un determinado virus y se validará la revisión de los valores obtenidos a través de una firma. Este mapa con los resultados deberá ser almacenado en un archivador con la identificación correspondiente.

Los resultados se informarán a través de la emisión de Informes Fitosanitarios del SISVEG, indicando **POSITIVO o NEGATIVO**, según corresponda para cada virus analizado. En el caso que una serie de correlativos tenga los mismos resultados, se puede ingresar sólo uno que aplique a la serie. Pero si dentro de la serie existen resultados distintos, se deberá ingresar en forma individual el resultado distinto asociado al correlativo correspondiente.

En el caso que se requiera que los resultados sean expresados como porcentaje de virosis, el Servicio deberá establecer la metodología de este cálculo y la forma como será informado en el sistema SISVEG, para lo cual el laboratorio será capacitado e instruido al respecto. Los acuerdos técnicos serán agregados como apéndices o anexos a este instructivo.

6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS

Los resultados deberán ser ingresados a una base de datos y autorizados por el responsable técnico del laboratorio autorizado, mediante la utilización del sistema computacional SISVEG, en un plazo máximo de 8 días, desde la fecha de muestreo.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-016

Versión:01

Una vez ingresados los resultados, el laboratorio deberá notificar lo anterior en forma escrita (vía correo electrónico, fax u otro), a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra, con copia al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, indicando el o los números de folio de protocolo (con su correspondiente correlativo) que fueron ingresados al sistema.

Cabe hacer presente, que el informe emitido por SISVEG no será un documento válido para la emisión del certificado de exportación, situación que deberá ser comunicada por el laboratorio autorizado a sus clientes en caso de consulta.

En caso que el laboratorio autorizado prevea cualquier atraso en el tiempo de respuesta de alguna muestra, deberá informarlo con 24 horas de anticipación a la fecha límite de respuesta, vía correo electrónico a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra y al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, indicando el número de la muestra (folio de protocolo con su respectivo correlativo) en esa situación.

El laboratorio deberá contar con un libro de registro y/o planilla digital formato tipo Excel de resultados de muestras que incluya el N° de folio de protocolo con su correlativo respectivo, fecha de recepción, aceptación/rechazo, resultado (positivo, negativo o porcentaje según sea el caso), fecha de resultado, firma del analista y observaciones.

Además, el laboratorio deberá mantener un archivador con una copia firmada de los Informes Fitosanitarios de los resultados ingresados y autorizados en el sistema computacional SISVEG, junto a la orden de análisis y al registro fotodocumentado del análisis molecular si es que correspondiera.

Todos los registros y documentos se deben conservar al menos durante los 5 años siguientes de realizado el análisis.

Cualquier información obtenida producto del proceso de análisis (resultados parciales o totales u otro), será de carácter confidencial entre el laboratorio autorizado y el SAG. En caso de no respetarse lo anterior, será considerado como una no conformidad crítica y causal de suspensión inmediata de la autorización.

7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS

Todo laboratorio autorizado será supervisado mediante visitas al menos una vez al año. Sin embargo, deberá estar dispuesto a recibir supervisiones adicionales, en cualquier momento.

El Encargado de Supervisión SAG del laboratorio autorizado, podrá solicitar a este último en cualquier momento, el envío de contramuestras, para ser analizadas por el SAG. En el caso de no haber concordancia con los resultados, se programará una visita de supervisión para verificar la conducción del ensayo y determinar las medidas que correspondan.

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias detecta faltas en el desempeño del laboratorio autorizado, que pongan en riesgo el resultado del Programa de Material de Propagación de Exportación asociado a su autorización, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN

Código: D-GF-CGP-PT-016

Versión:01

cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al laboratorio autorizado mediante una carta suscrita por un Director/a Regional o Jefe/a de Oficina o Jefe/a de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización hasta que el SAG resuelva en definitiva su caso.

8 OBLIGACIONES

El laboratorio autorizado ante el SAG para la ejecución de labores asociadas al diagnóstico de virus en tejido vegetal de bulbos ornamentales de exportación, sin perjuicio de las obligaciones señaladas en el numeral 7 de la versión vigente del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos, tendrán las siguientes obligaciones específicas:

- En el caso que, por motivos del transporte propiamente tal, las muestras arriben al laboratorio en mal estado o no cumplan con las condiciones específicas para realizar los análisis (es decir, estado de descomposición u otro), el laboratorio autorizado deberá cambiar de empresa de transporte de encomiendas o courier, cuando tal situación ocurra en 3 oportunidades consecutivas, dando cuenta de tal situación a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra y al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, mediante documento escrito enviado vía correo electrónico o FAX.
- En caso de cambio o término abrupto de convenio entre la empresa de transporte de encomienda y el laboratorio autorizado, éste deberá dar aviso por escrito (vía correo electrónico u otro) en forma inmediata al Encargado(a) Nacional de Material de Propagación de Exportación del SAG, con copia al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio.
- No podrá ejercer como laboratorio autorizado para el diagnóstico de virus en tejido vegetal de bulbos ornamentales de exportación, cuando el representante legal, socios, directores, accionistas, gerentes, responsable técnico o personal de la empresa tengan un interés directo e incompatible con la actividad para la cual fue autorizada, como ser propietario de los bulbos que se desean certificar, u otras que determine el Servicio.



**LISTA DE ANALISTAS DEL LABORATORIO
VINCULADOS AL DIAGNÓSTICO**

Código: F-GF-CGP-PT-083

Versión:01

Nombre Completo	Nº Cédula de Identidad	Firma	Media firma

Firma del postulante o representante legal

Fecha recepción SAG:.....



**DECLARACIÓN JURADA PARA LA DESIGNACIÓN DEL
LABORATORIO AUTORIZADO QUE PRESTARÁ
SERVICIOS DE ANÁLISIS**

Código: F-GF-CGP-PT-084
Versión:01

Por el presente instrumento, yo,
....., cédula de identidad N°,
de nacionalidad, con domicilio en
.....,
comuna de, persona encargada del material vegetal de
exportación de bulbos ornamentales de la empresa multiplicadora
....., declaro bajo juramento:

1- Que todas las muestras vegetales obtenidas de los lotes de material madre o lotes de plantación de bulbos ornamentales inscritos por la empresa multiplicadora antes indicada para la certificación fitosanitaria de exportación, que están ubicados en la comuna de, deberán ser enviadas al siguiente laboratorio autorizado para que realice el diagnóstico de virus :

- Nombre o Razón social del laboratorio:.....
- Dirección del laboratorio:
- Correo electrónico del laboratorio:
- Teléfono del laboratorio:

2- Que ante una modificación en la designación del laboratorio autorizado, informaré al SAG en un plazo no superior a 48 horas, el nombre del nuevo laboratorio autorizado al cual el Servicio deberá enviar las muestras vegetales, obtenidas desde bulbos madres o desde campo, de la empresa multiplicadora antes señalada.

Personal encargado
Empresa multiplicadora

Nombre o representante legal
Laboratorio autorizado

Fecha recepción SAG:.....



**EMPRESA DE TRANSPORTE DE ENCOMIENDAS O
COURIER EN CONVENIO CON EL LABORATORIO
AUTORIZADO**

Código: F-GF-CGP-PT-085
Versión:01

Nombre empresa courier	Número de cuenta	Fecha de convenio	Fono contacto

Firma del postulante o representante legal

Fecha recepción SAG:.....



**RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE EN TEJIDO VEGETAL DE
BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN**

Código: F-GF-CGP-PT-086

Versión:01

Logo Laboratorio Autorizado

INICIO RECEPCION MUESTRAS

Fecha aviso	
--------------------	--

ANTECEDENTES TERCERO AUTORIZADO (Emisor)	
Nombre Laboratorio Autorizado	
Nombre Responsable Técnico	
Dirección Oficina/Comuna	
Fax	
Teléfono(s) (fijo/móvil)	

ANTECEDENTES SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (Uso exclusivo SAG)			
Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias – Unidad Virología			
Nombre Personal Receptor			
Firma Personal Receptor		Fecha Recepción	

ANTECEDENTES RECEPCION MUESTRAS					
Informo a usted que a partir de _____(indicar fecha) se han empezado a recepcionar muestras vegetales para diagnóstico de virus en tejido vegetal o lotes de bulbos ornamentales de exportación, correspondientes a la temporada_____/_____, de acuerdo al siguiente detalle:					
N° Protocolo	N° de Folio	Región	Comuna	Oficina SAG que envía la muestra	
NOMBRE			FIRMA		
RESPONSABLE TECNICO LABORATORIO AUTORIZADO					

 <p>SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile</p>	<p>RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN</p>	<p>Código: D-GF-CGP-PT-086 Versión:01</p>
--	---	---

Instrucciones de llenado y uso del formulario:

Este aviso debe ser:

- Enviado al Departamento de Laboratorios del Servicio Agrícola y Ganadero, el día en que se recepciona el primer PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS.
- Enviado al SAG, hasta 24 horas de iniciado el proceso de recepción, vía fax, correo electrónico (escaneado) o entregado personalmente en las dependencias del Departamento de Laboratorios del Servicio, oficina de partes.
- Mantenido en forma documental (5 años), en las dependencias del laboratorio autorizado y deberá estar disponible para las supervisiones que realicen el personal del Servicio.
- Este aviso sólo será válido con el nombre y firma del responsable técnico.

Fecha aviso: se debe indicar la fecha en que se envía el documento al SAG.

Antecedentes del laboratorio autorizado (emisor):

Nombre responsable técnico. Indicar nombre completo del responsable técnico, designado por el laboratorio autorizado.

Dirección oficina/comuna: indicar el lugar donde se mantendrán/analizarán las muestras y los registros documentales de las actividades que el laboratorio autorizado desarrollará.

Fax: indicar número de fax del laboratorio autorizado.

Teléfono(s) fijo/móvil: indicar teléfonos, ya sea de red fija o móvil, donde se pueda establecer contacto con el laboratorio autorizado y el responsable técnico.

Antecedentes Servicio Agrícola y Ganadero (receptor):

Nombre personal SAG receptor: debe ser llenado por el personal SAG que recepciona este documento, para lo cual debe dejar registrado su nombre completo.

Firma personal SAG receptor: el personal SAG debe firmar el documento

Fecha de recepción: corresponde a la fecha de recepción del documento, debe ser llenado por el personal SAG que lleva a cabo esta acción.

Antecedentes recepción muestras:

Región: indicar la región en la que se ubica el lugar de almacenaje de los bulbos madres o el lugar de producción de los bulbos ornamentales.

Comuna: indicar la comuna en la que se ubica el de almacenaje de los bulbos madres o el lugar de producción de los bulbos ornamentales.

Folio protocolos: indicar los folios de los protocolos que se están recepcionando, en la fecha señalada.

Oficina SAG que envía muestra: indicar la oficina SAG que ejecuta la acción.

Nombre/firma responsable técnico: indicar nombre y firma de responsable técnico del laboratorio autorizado.