

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

TABLA DE CONTENIDOS

1	OBJETIVOS Y ALCANCE	3
2	REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	4
3	DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	5
4	REQUISITOS	5
4.1	REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA, EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	5
4.2	REQUISITOS DE PERSONAL	11
4.3	Requisitos Específicos	12
4.4	Medios de verificación de requisitos	12
5	ANÁLISIS/ENSAYO	13
5.1	Condiciones previas	13
5.2	Captación, registro y despacho de las muestras	14
5.3	Recepción de la muestra y manejo de la muestra/contramuestra	14
5.4	Metodología	16
6	REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS	20
7	SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	21
8	OBLIGACIONES	22
9	FORMULARIOS Y ANEXOS	23

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.

La determinación de los virus podrá realizarse en bulbos frescos, bulbos dormantes o follaje, a través de las técnicas de ELISA, PCR en tiempo real o PCR convencional. La técnica a utilizar dependerá de la matriz de análisis y se encuentra detallada en el Cuadro N° 1.

Cuadro N° 1. Técnica a utilizar según matriz

VIRUS	TÉCNICA A UTILIZAR SEGÚN MATRIZ	
	MATRIZ FOLLAJE	MATRIZ BULBOS
Alfalfa mosaic virus (AMV)	ELISA	No aplica
Arabis mosaic virus (ArMV)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real
Cucumber mosaic virus (CMV)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real
Impatiens necrotic spot virus (INSV)	ELISA	No aplica
Iris yellow spot virus (IYSV)	ELISA	No aplica
Lily mottle virus (LMOV)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real
Lily symptomless virus (LSV)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real
Lily virus X (LVX)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real
Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real
Prunus necrotic ringspot virus (PNRV)	ELISA	No aplica
Strawberry latent ringspot virus (SLRV)	ELISA	ELISA
Tobacco rattle virus (TRV)	PCR convencional	No aplica

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

Código: D-ATR-AAT-016

Versión:02

VIRUS	TÉCNICA A UTILIZAR SEGÚN MATRIZ	
	MATRIZ FOLLAJE	MATRIZ BULBOS
Tobacco ringspot virus (TRSV)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real
Tomato bushy stunt virus (TBSV)	ELISA	ELISA
Tomato ringspot virus (ToRSV)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	ELISA	No aplica
Tulip breaking virus (TBV)	ELISA	ELISA o PCR en tiempo real

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 con el procedimiento descrito en el numeral 13 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.

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. En caso de metodologías que estén patentadas y presenten resguardo, serán consideradas como válidas, solamente si, presentan acreditación ISO 17.025.

2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Resolución Exenta N° 3571, de fecha 25 de mayo del 2020, del Director Nacional del SAG Servicio Agrícola y Ganadero, que aprueba el Reglamento General del 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.
- Resolución Exenta del Director Nacional N° 2.455 de fecha 30 de abril de 2013, del Director Nacional del Servicio Agrícola y Ganadero, que oficializa sistema y requisitos para la certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación.
- Procedimiento de Certificación Fitosanitaria Certificación de Productos Agrícolas y Forestales de Exportación P-CER-CER-PA-001

 <p>SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile</p>	<p>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN</p>	<p>Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------

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.
ELISA	Enzyme Linked Inmuno Assay (Inmuno análisis ligado a enzimas)
RT-PCR	Reacción de la polimerasa en cadena asociada a una etapa previa de retro transcripción.
PCR en tiempo real	Modalidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).
Virus fitopatógeno	Agente virulento que es capaz de infectar una planta.
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.
Ct	Del inglés cycle threshold, equivale al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia y es inversamente proporcional a la cantidad inicial del ADN blanco.

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 salas separadas, para evitar contaminación cruzada.

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

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02
-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

El equipamiento de cada sala y área es exclusivo y no puede ser usado en otra área del laboratorio. El personal, al ingresar, debe utilizar delantal y guantes exclusivos de cada sala.

La técnica de DAS ELISA requiere contar con 3 salas separadas: sala de lavado, sala de preparación de muestras y sala de serología.

Para desarrollar la técnica RT-PCR convencional (para el análisis de TRV) y/o RT-PCR en Tiempo real, el laboratorio debe contar al menos con cuatro salas separadas:

- Sala de preparación de soluciones, debe ser un espacio limpio donde se prepararán los reactivos y soluciones asociadas a la extracción de ARN.
- Sala de extracción de ARN, como su nombre lo indica tiene como fin la aislación de ARN total a partir de las muestras del alcance, para que sirva como templado en los análisis de RT-PCR (convencional y/o tiempo real).
- Sala de Amplificación debe contener a lo menos tres áreas separadas:
 - Área de preparación de Mix, donde se preparan las mezclas de reacción que serán utilizadas en la retrotranscripción y PCR, para ello debe contar con una cabina de PCR cerrada que posea luz ultravioleta donde se manipularan todos los reactivos para preparar mezclas de PCR y en su interior deben mantenerse la micropipetas, microtubos y gradillas de uso exclusivo.
 - Área de dispensación de templado, en esta se agregarán los templados (ARN) a las mezclas de PCR que han sido preparadas, para ello debe contar con cabina de PCR cerrada que posea luz ultravioleta o similar, este espacio debe contener micropipetas, gradillas, puntas y microtubos de uso exclusivo.
 - Área de amplificación, aquí se encuentran localizados los termocicladores donde una vez programados y ubicados las mezclas de reacción, se lleva a efecto la amplificación de las muestras analizadas, que para el caso del PCR en tiempo real, también se realiza la detección.
- Por último, la sala de electroforesis, para el caso del PCR convencional, una vez finalizada la reacción en el termociclador, los productos de PCR deben ser separados por electroforesis para su detección. Luego esta sala debe contar con cámaras de electroforesis, fuentes de poder, reactivos y los materiales requeridos para su funcionamiento.

Por último, 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 disponer de los equipos necesarios, acordes al volumen de muestras, para garantizar el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar y el cumplimiento de los plazos de entrega de resultados.

Los equipos deben someterse a mantención y/o calibración conforme a las especificaciones del fabricante o al menos una vez cada dos años. El Tercero Autorizado debe tener disponible los correspondientes certificados.

A continuación, se detalla el equipamiento mínimo que se debe considerar para cada técnica:

Técnica Serológica DAS-ELISA

- 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, con una 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).

Técnica RT-PCR convencional

- Gabinete para preparación de mix de síntesis de cADN y PCR.
- Gabinete para dispensar muestra de ARN.
- Balanza rango de uso 0,01 a 500 gr. con una resolución de 0,1 gr.
- Micro-Centrífuga (hasta 14000 r.p.m.)
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 μl , de uso exclusivo para la técnica
- Refrigerador que alcance una temperatura de $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$
- Conservadora de muestras a que alcance una temperatura entre $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$
- Freezer $-20 \pm 3^\circ\text{C}$.
- Mezclador Vortex
- Termociclador
- Fuente poder.
- Cámara de electroforesis
- Sistema de registro fotográfico.
- Centrifuga
- Baño termo-regulado.

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

Código: D-ATR-AAT-016

Versión:02

Técnica RT-PCR tiempo real

- Gabinete para preparación de mix de síntesis de cADN y PCR.
- Gabinete para dispensar muestra de ARN.
- Balanza rango de uso 0,01 a 500 gr. con una resolución de 0,1 gr.
- Micro-Centrífuga (hasta 14000 r.p.m.)
- Micropipetas de 10, 100 y 1000ul, de uso exclusivo para la técnica
- Refrigerador que alcance una temperatura de 6°C±2°C
- Conservadora de muestras a que alcance una temperatura entre 6°C±2°C
- Freezer -20±3 °C.
- Mezclador Vortex
- Termociclador de tiempo real
- Centrifuga
- Baño termo-regulado.

4.1.3 REQUISITOS DE MATERIALES Y REACTIVOS

El laboratorio debe contar con los materiales, reactivos y material de referencia acordes al volumen de muestras recibida (stock suficiente para los análisis de la temporada), para garantizar el correcto desarrollo de la técnica de análisis a realizar y la entrega oportuna de los resultados.

Deberá contar con todos los kits de diagnósticos y/o reactivos necesarios para analizar todos los virus indicados en el alcance de la presente autorización.

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

DAS-ELISA

Requiere para su desarrollo los Kit de diagnóstico de las marcas indicadas en la siguiente tabla:

VIRUS	Marca KIT
Alfalfa mosaic virus (AMV)	Bioreba y Agdia
Arabis mosaic virus (ArMV)	Bioreba, Loewe y BQ support.
Cucumber mosaic virus (CMV)	Bioreba y Agdia
Impatiens necrotic spot virus (INSV)	DSMZ y Bioreba
Iris yellow spot virus (IYSV)	Loewe y DSMZ
Lily mottle virus (LMoV)	BQ Support
Lily symptomless virus (LSV)	BQ Support, Adgen-Neogen y Agdia

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

Código: D-ATR-AAT-016

Versión:02

VIRUS	Marca KIT
Lily virus X (LVX)	BQ Support
Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)	Agdia
Prunus necrotic ringspot virus (PNRV)	Bioreba
Strawberry latent ringspot virus (SLRV)	Bioreba
Tobacco ringspot virus (TRSV)	Agdia y Bioreba
Tomato bushy stunt virus (TBSV)	Bioreba
Tomato ringspot virus (ToRSV)	Agdia y Bioreba
Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Bioreba
Tulip breaking virus (TBV)	BQ Support

El laboratorio podrá presentar otro kit diagnóstico para ser evaluado por el Servicio, para lo cual deberá enviar las validaciones correspondientes del kit.

Además, se requieren de los siguientes insumos:

- Placas ELISA Nunc Maxisorp.
- Puntas de micropipetas 10, 100 y 1000 µL.
- Microtubos de 1 y 2 mL.
- Bolsas de extracción.
- Tampón de extracción ELISA o reactivos necesarios para preparación.
- Tampón de lavado o reactivos necesarios para preparación.
- Tampón conjugado o reactivo para preparación.
- Tampón sustrato o reactivos para preparación.
- Sustrato p-nitrofenilfosfato.

RT-PCR convencional

La detección de Tobacco rattle virus (TRV) se realiza por PCR convencional, se requiere de los siguientes insumos y reactivos como mínimo:

- bolsa de extracción
- buffer de extracción silica o reactivos para preparación.

- microtubo de 1,5 y 2,0 ml
- microtubos de 0,2 mL o placas de PCR
- Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 μ L.
- sarcosina al 10%
- β – mercaptoetanol.
- Hielo.
- solución de yoduro de sodio (NaI).
- etanol absoluto
- suspensión de silica.
- buffer de lavado
- agua libre de nucleasas
- Buffer 5x
- dNTPs 10 mM
- DTT 0.1 mM
- MMLuV 200 U/uI
- Partidor TRV-262 (F) GACGTGTGTAAGGTT
- Partidor TRV-261 (R) CAGTCTATACACAGAAACAGA
- Buffer Taq Polymerasa10X
- MgCl₂ 50 mM
- Taq Polymerase 5 U u/I
- Buffer 10x
- Agarosa
- TAE 1X
- Ladder 50 o 100 pb.

RT-PCR en tiempo real

Para la detección de virus por esta técnica, se requiere de los siguientes insumos y reactivos como mínimo:

- bolsa de extracción
- buffer de extracción silica o reactivos para preparación.
- microtubo de 1,5 y 2,0 ml
- microtubos o placas de 0,2 mL para pcr en tiempo real.
- Puntas para micropipetas de 10, 100 y 1000 μ L.

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	<p>Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02</p>
----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------

- sarcosina al 10%
- β – mercaptoetanol.
- Hielo.
- solución de yoduro de sodio (NaI).
- etanol absoluto
- suspensión de silica.
- buffer de lavado
- agua libre de nucleasas
- Partidores para cada virus.
- Sondas para tiempo real específicas para cada virus.
- Kit para RT-PCR en tiempo real en un paso.

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 del país correspondiente al domicilio del laboratorio. Este Título debe corresponder 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.
- Demostrar experiencia laboral en el área de laboratorios de al menos dos (2) años.
- Demostrar competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 6 meses) comprobable, en diagnósticos de virología, DAS-ELISA, RT-PCR convencional y/o RT-PCR en tiempo real.

4.2.2 ANALISTAS

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

- Contar con título profesional o técnico o ser egresado/a, de una carrera correspondiente al área silvoagrícolas, bioquímicas, biotecnológicas o biológicas, impartida por una entidad de enseñanza superior reconocida por el Estado del país correspondiente al domicilio del laboratorio. En caso de título obtenido en

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

Código: D-ATR-AAT-016

Versión:02

el extranjero, éste deberá estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.

- Demostrar tener competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 6 meses) comprobable en diagnósticos de virología vegetal, DAS-ELISA, RT-PCR convencional y/o RT-PCR en tiempo real.

El laboratorio, previendo una eventual ausencia del/la responsable técnico o de los/las analistas, podrá postular a otras personas para que actúen en ausencia de los o las 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. Dicho subrogante, no podrá ejecutar funciones sin la previa revisión de antecedentes y autorización por parte del Servicio.

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 caso de que se utilicen técnicas diagnósticas que estén sujetas a propiedad intelectual el laboratorio deberá tener estas técnicas acreditadas mediante la norma ISO 17.025. 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.

En caso de perder la acreditación ISO 17.025, se determinará la pérdida de calidad de autorizado.

En caso de que el laboratorio deba conservar las muestras para enviarlas a otro laboratorio autorizado, deberá presentar al Servicio los protocolos de preparación y conservación de dichas muestras

4.4 Medios de verificación de requisitos

De acuerdo con 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**, código F-ATR-AAT-068, 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-ATR-AAT-016

Versión:02

5. Formulario de identificación del responsable técnico, según formato establecido en el formulario F-ATR-AAT-69 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-ATR-AAT 113 del presente instructivo.
8. Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificadas en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
9. Documentos que acrediten la competencia técnica y/o experiencia laboral del/la responsable técnica en las áreas de virología y serológicas y/o técnicas moleculares, según corresponda.
10. Documentos que acrediten la competencia técnica y/o experiencia laboral de los/las analistas en las áreas de virología y serológicas y/o técnicas moleculares, según corresponda.
11. Manual de procedimientos de acuerdo con 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

5.1.1 Acuerdo previo para la realización de análisis

Cada laboratorio autorizado deberá suscribir con los productores un acuerdo previo, para la realización de los análisis, mediante la firma simple del formulario "Declaración jurada para la designación del laboratorio autorizado", F-ATR-AAT-084. Copia de este acuerdo debe enviarse en forma electrónica, a los correos electrónicos exportaciones.mapro@sag.gob.cl y autorizacion@sag.gob.cl, información que será publicada en la intranet junto con el listado actualizado de laboratorios.

5.1.2 Contratación empresa para el traslado de las muestras

Cada laboratorio autorizado debe establecer un convenio con una empresa de transporte de encomiendas o Courier para el traslado de las muestras tomadas por el SAG.

El laboratorio debe informar el nombre de la empresa contratada y el número de cuenta del convenio establecido con ésta, enviando el formulario "Empresa(s) de transporte de encomiendas o Courier en convenio", F-ATR-AAT-85, a los correos electrónicos exportaciones.mapro@sag.gob.cl y autorizacion@sag.gob.cl. Esta

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02
-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

información será publicada en la Intranet del Servicio para conocimiento de los Inspectores/as.

La empresa contratada por el Tercero Autorizado debe corresponder a 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.

5.2 Captación, registro y despacho de las muestras

La captación de las muestras será realizada de acuerdo con lo establecido en el Procedimiento "Certificación Fitosanitaria de Productos Agrícolas y Forestales de Exportación" P-CER-CER-PA-001, por lo tanto, no es una actividad de competencia de los laboratorios autorizados en esta especialidad.

La Oficina SAG correspondiente, creará en el Sistema computacional SISVEG u en otro sistema informático que el SAG determine en el futuro, un protocolo por cada lote de bulbos 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 SISVEG a través del Folio (previa asignación de cuenta y clave de usuario) y podrá ver los datos de la muestra y los virus fitopatógenos solicitados.

El despacho de las muestras al laboratorio autorizado será responsabilidad del personal de la oficina SAG sectorial bajo cuya jurisdicción se realice el muestreo utilizando los servicios de la empresa de encomienda o Courier contratado por el tercero autorizado.

En casos justificados SAG realizar el traslado de las muestras por sus propios medios o delegar en el productor su despacho, ya sea a través de la empresa de Courier contratada por el Tercero Autorizado o a costas propias.

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 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, Para tal efecto deberá utilizar un documento según formato establecido en el formulario Recepción de Muestras de Tejido Vegetal de Bulbos Ornamentales de Exportación, F-ATR-AAT-086, el cual debe ser validado con el nombre y firma del responsable técnico.

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) u otro sistema que el SAG determine en el futuro y acompañada por la hoja de envío correspondiente.

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02
-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

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 en el Oficio que acompaña la muestra, 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. Copia del oficio debe ser enviada por correo electrónico a la Oficina SAG de origen.

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.

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

En caso que las muestras no estén 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 al correo electrónico exportaciones.mapro@sag.gob.cl 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 del 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, u otro sistema definido por el SAG. Una vez realizada la recepción se podrá imprimir la "Orden de Análisis" SISVEG, u otro sistema definido por el SAG, 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 $6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.2 MANEJO DE MUESTRA Y CONTRA MUESTRA

DAS-ELISA

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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Además, para las muestras positivas, se deberá conservar contramuestras de tejido, a -20°C durante al menos -6 meses posteriores a la recepción de la muestra.

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02
----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

RT-PCR convencional y/o Tiempo real

Para las muestras que requieran análisis por RT-PCR convencional o RT-PCR en tiempo real, se tomarán 0,1 g de tejido que se extraerán por el método de la sílica (anexo 7) u otro método validado por el laboratorio.

El laboratorio deberá mantener las extracciones de ARN y el cDNA de las muestras, a $-20 \pm 2^\circ \text{C}$ y por al menos 6 meses, después de realizado el análisis.

En el caso de los **positivos**, contramuestras de tejido, deberán ser conservadas a $-20 \pm 2^\circ \text{C}$, por un período mínimo de tres meses posteriores a la recepción de la muestra.

5.4 Metodología

DAS-ELISA

Para el caso de los análisis en bulbos, las muestras se componen de 240 escamas, las que, a la vez se sub-agruparán de dos (2) escamas para componer 120 submuestras que serán maceradas en buffer de extracción.

En las muestras vegetales (tejido foliar) captadas en campo, el analista revisará la muestra en busca de síntomas en las hojas y tomará 0,5 g. de este tejido que será utilizado en el análisis de ELISA.

Posteriormente, se aplica la metodología de análisis de DAS-ELISA 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 infectada 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. Los blancos consisten en celdas sensibilizadas con anticuerpos y que como muestra, se les aplica buffer de extracción sin muestra y siguiendo 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-ATR-AAT-016 Versión:02
----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

Debido a que todos los kits 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 diagrama de carga de las muestras.

RT-PCR convencional

La técnica molecular de RT-PCR convencional, consiste en términos generales en la extracción de ARN total a partir de 0,1 g de tejido foliar, el cual es utilizado en una retro-transcripción para sintetizar cDNA que es usado como molde para la amplificación con partidores específicos para los virus a analizar.

RT-PCR en tiempo real

Para la técnica molecular de RT-PCR en tiempo real, las muestras corresponden a 24 bulbos, que se separan en 10 submuestras conformada por 24 escamas del anillo exterior de cada bulbo. Luego de cada una de estas submuestras se escinde con un sacabocado, una fracción compuesta por las 24 escamas para realizar la extracción de ARN que se utilizara en el RT-PCR por tiempo real.

Cada proceso de extracción de ARN, se debe incorporar al menos un control positivo y un control negativo de extracción, para poder evaluar que esta etapa del análisis ha sido realizada adecuadamente en términos de eficiencia y la ausencia de contaminación.

Además, en la etapa de amplificación se deben incluir a lo menos un control positivo, un control negativo y un control de coctel. Los controles positivos corresponderán a extracciones de ARN provenientes de tejido vegetal que estén infectadas por el virus a analizar, los controles negativos corresponderán a extracciones de ARN provenientes de tejido vegetal sin presencia de virus y el control coctel corresponde al uso de agua de PCR en vez de muestra. Todos los controles deben ser previamente validados en su condición y ser almacenados a -20° C.

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 10 días corridos desde la fecha de recepción en el laboratorio hasta la emisión del informe fitosanitario con los resultados en el sistema SISVEG.

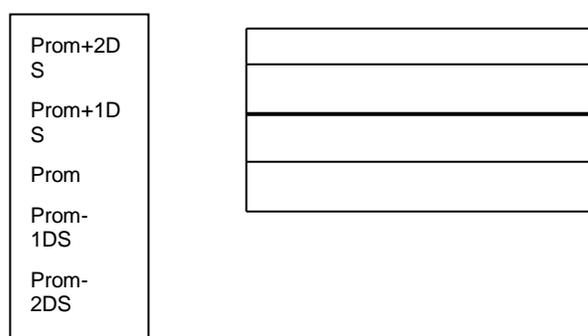
5.4.1 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

DAS-ELISA

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.
 - 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.

RT-PCR convencional

Los resultados obtenidos serán validados, sólo si, se cumplen las siguientes condiciones, el control positivo de extracción y el control positivo de RT-PCR deben

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02
-----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

presentar una banda del tamaño esperado. Además, el control negativo de extracción, el control negativo de RT-PCR y el control de coctel, no presentan banda.

RT-PCR en Tiempo real

Los resultados obtenidos serán validados, sólo si, se cumplen los siguientes criterios: el control positivo de extracción y el control positivo de RT-PCR, deben presentar una Ct superior al Ct límite de detección. Además, el control negativo de extracción y el control negativo de RT-PCR y el control de coctel, presentan un Ct menor o igual al Ct límite de detección preestablecido.

5.4.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

DAS- ELISA

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 repite se deberá dar aviso vía correo electrónico al Encargado de Supervisión de ese laboratorio, para evaluar las medidas a tomar.

RT-PCR convencional

Se determina que una muestra es positiva para TRV, al separar electroforéticamente los productos de RT-PCR y apreciar una banda de 463 bp, si no está presente la banda del tamaño esperado, se considera negativa. La estimación del tamaño de la banda se realiza comparando su distancia de migración en el gel respecto al marcador de peso molecular.

RT-PCR en Tiempo real

Se consideran positivas las muestra que presentan amplificaciones con un valor Ct inferior al Ct del límite de detección.

En el caso en que las muestras presenten valores de Ct, muy cercanos al Ct del límite de detección, y que generen duda del resultado; se debe repetir el análisis para la muestra problema con 10 réplicas. Si la muestra no amplifica las 10 repeticiones, se entiende que es negativa; caso contrario la muestra, se considera positiva.

5.4.3 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

DAS-ELISA

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.

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02
----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

RT-PCR convencional

Los resultados serán registrados en planilla "orden de carga de los productos de PCR" de tal forma que se asocie a una muestra específica. La corrida electroforética será fotografiada y su impresión quedará adjunta a registro de carga respectiva.

RT-PCR en Tiempo real

Los resultados serán registrados en una planilla de análisis de PCR en tiempo real que asocie a una muestra específica con su Ct, Ct límite, virus analizado, resultado asignado, fecha y analista. Además, se adjuntará hoja de reporte entregada por equipo que permita trazar la muestra.

La información de cada muestra analizada generada por el termociclador de tiempo real será respaldada en un disco externo de manera mensual, de tal manera de asegurar la información.

5.4.4 INFORME DE RESULTADOS

Independiente de la técnica utilizada los resultados se informarán a través 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. Además, se deberá indicar la técnica utilizada cada vez que se ingrese un resultado.

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 10 días, desde la fecha de muestreo.

Una vez ingresados los resultados al sistema SISVEG el laboratorio deberá notificarlo por correo electrónico, 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 respondidos.

Adicionalmente, los resultados positivos deben ser avisados por correo electrónico al/la encargado/a de la Sección Material de Propagación al correo exportaciones.mapro@sag.gob.cl. En un plazo máximo de 1 día hábil de obtenido el resultado.

Será responsabilidad de los a las supervisoras de las oficinas sectoriales, informar los resultados de los análisis al productor, traspasando los resultados a porcentajes, cuando así corresponda. El plazo para entregar esta información al productor es de 5 días hábiles desde que éstos son informados por el laboratorio autorizado.

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

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02
----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

En caso de 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.

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

En caso de detectarse no conformidades o faltas en el desempeño del tercero, que no ameriten la aplicación de una medida por incumplimiento, el Servicio indicará en el informe de supervisión los puntos a subsanar y el plazo para ello. Posteriormente, el Servicio realizará una segunda supervisión, la cual podrá ser presencial o documental, que tendrá como objeto verificar que fueron subsanadas. De mantenerse las no conformidades o faltas, el Servicio efectuará una tercera supervisión con el objeto antes señalado, y así sucesivamente hasta que se corrija la totalidad de no conformidades y faltas detectadas.

Por cada una de las supervisiones adicionales a las establecidas en el presente Instructivo Técnico, el tercero deberá pagar la tarifa respectiva.

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

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS EN TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN	Código: D-ATR-AAT-016 Versión:02
----------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------

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 cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al laboratorio autorizado, 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 Reglamento General y en la versión vigente del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos, tendrán las siguientes obligaciones:

- Suscribir el convenio de autorización, el cual especifica las acciones para las cuales se encuentra autorizado y las obligaciones a las que se compromete. A través de la suscripción del convenio, el tercero se compromete a dar cabal cumplimiento a lo establecido por el Servicio.
- Adoptar todas las medidas necesarias para mantener y cumplir las condiciones, requisitos y calidades que permitieron su autorización.
- Notificar al Servicio de cualquier evento o circunstancia de modificación o pérdida sobreviniente de una o más de las condiciones, requisitos o calidades que permitieron su autorización, dentro de 5 días siguientes de haberse producido.
- Facilitar y cooperar en las actividades de supervisión que el Servicio realice a su gestión como autorizado.
- Mantener bajo estricto control y reserva la información, registros, formularios y otros antecedentes emanados del ejercicio de la actividad para la que se encuentra autorizado.
- 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.
- 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)

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

Código: D-ATR-AAT-016

Versión:02

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.
- Informar al Servicio en caso que se presente alguna de las inhabilidades o incompatibilidades establecidas en el Reglamento General que norma el Sistema Nacional de Autorización.

9 FORMULARIOS Y ANEXOS

ANEXO N°1	EXTRACCIÓN SÍLICA
ANEXO N°2	PROTOCOLO DE RT-PCR CONVENCIONAL PARA TRV
F-ATR-AAT-084	DECLARACIÓN JURADA PARA LA DESIGNACIÓN DEL LABORATORIO AUTORIZADO QUE PRESTARÁ SERVICIOS DE ANÁLISIS
F-ATR-AAT-085	EMPRESA DE TRANSPORTE DE ENCOMIENDAS O COURIER EN CONVENIO CON EL LABORATORIO AUTORIZADO
F-ATR-AAT-086	RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN

ANEXO N° 1 EXTRACCIÓN SÍLICA

METODOLOGÍA

1. Colocar 0,1 gramo de tejido al interior de una bolsa de polietileno mantenida en hielo y adicionar 1 ml de Buffer de Extracción de silica, macerar la muestra.
2. Transferir 0,5 ml del extracto a un tubo Eppendorf libre de nucleasas y adicionar 0,1 ml de Sarcosina al 10% más 1,5 μ l de β -mercaptoetanol.
3. Incubar 10 minutos a 70°C con agitaciones periódicas cada 2 minutos.
4. Traspasar a hielo por 2 minutos y luego centrifugar a 12.000 rpm. 5 minutos.
5. Transferir 0,3 ml. del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y adicionar 300 μ l de NaI, 150 μ l de etanol absoluto y 25 μ l de suspensión de partículas de Silica. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos con agitaciones periódicas (2 minutos).
6. Centrifugar a 6000 rpm. Durante 1 minuto, eliminar el sobrenadante y adicionar 0,5 ml. de buffer de lavado. Mezclar en vortex para resuspender el pellet.
7. Repetir el paso N°6.
8. Eliminar el sobrenadante con cuidado y secar el pellet a temperatura ambiente invirtiendo el tubo.
9. Resuspender el pellet en 0,1 ml. de agua libre de nucleasas e incubarlo durante 2 minutos a 70°C.
10. Centrifugar a velocidad máxima durante 3 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
11. Almacenar a 80°C.

BUFFER DE EXTRACCIÓN SÍLICA

Compuesto	Cantidad
Guanidin tiocianato (MM 118.2 g/mol)	118,2 gr.
Acetato de Sodio 1M, Ph 5.2	50 ml
EDTA (MM 372.2 g/mol)	2.33 gr.
Acetato de potasio (MM 98.14 g/mol)	24.53 gr
PVP-40	6.25 gr
Metabisulfito de Sodio	5,0 gr.
Agua Libre de nucleasas	Enrazar a 250 ml

ANEXO N° 1 EXTRACCIÓN SÍLICA

SOLUCIÓN DE YODURO DE SODIO

Compuesto	Cantidad
Yoduro de sodio	36 gr.
Disulfito de sodio	0.75 gr.
Agua Libre de nucleasas	Enrazar a 40 ml

BUFFER DE LAVADO

Compuesto	Cantidad
Tris HCl 0.1 M Ph 7.5	20 ml
EDTA disodico	0,037 gr
NaCl	0,58 gr
Agua destilada estéril	100 ml
Etanol absoluto	100 ml
200 ml volumen final	

PREPARACIÓN DE SILICA

1. Pesar 60 grs de Silica, traspasar a una probeta de 1 litro y agregar 500 ml agua libre de nucleasas, mezclar bien y dejar decantar por 24 horas.
2. Descartar 470 ml de sobrenadante.
3. Agregar 500 ml de agua libre de nucleasas, mezclar y dejar decantar 5 horas.
4. Descartar 440 ml de sobrenadante.
5. Los 60 ml restantes ajustar a pH 2 con HCl (aprox 600 µl HCl 32%).
6. Autoclavar por 20 minutos a 121°C, alicuotar en tubos de 1,5 libras de nucleasas y mantener refrigerado y en oscuridad.

ANEXO N°2

PROTOCOLO DE RT-PCR CONVENCIONAL PARA TRV

Se utilizan los partidores descritos por Robinson (1992), TRV-262 (Forward): GACGTGTGTAAGGGTT y TRV-261 (Reverse): CAGTCTATACACAGAAACAGA que generan un producto de amplificación de 463 bp.

CONDICIONES RT

Mix de Denaturación:

Reactivos	Vol. (µl)
Primer 261 10 µM	2,0
Agua DEPC	5,5
Volumen Final	7,5
RNA	5,0
Volumen Final	12,5

Etapas de denaturación: Incubar mix en termociclador a 95° C por 5 min, luego incubar en hielo por 4 min.

Luego agregar mix de síntesis previamente preparado según:

Reactivos	Vol. (µl)
Buffer 5X First strand	4,0
DTT 0,1 M	0,5
dNTPs 10 mM	2,0
MMLuV 200 U/µl	1,0
Volumen Final	7,5

La etapa de síntesis conlleva la mezcla del Mix denaturación con el Mix de síntesis (20 µl totales), agitar, dar un spin y llevar al termociclador a 42° C por 1 hora y luego dejar en hielo, para ser usado en PCR o almacenar a -20 °C hasta su uso.

CONDICIONES PCR

Se prepara mix de PCR de acuerdo a la siguiente las siguientes indicaciones:

Reactivo	Vol. (µl)
Agua	11,1
Buffer PCR 10X	2,5
dNTPs 10mM	0,75
MgCl ₂ 25mM	1,5
Primer 261 10µM	2,0
Primer 262 10µM	2,0

ANEXO N°2

PROTOCOLO DE RT-PCR CONVENCIONAL PARA TRV

Taq polimerasa 5U/ μ l	0.15
Volumen Final	20
cDNA	5
Volumen final	25

Luego se agita para mezclar bien, se da un spin y se pone en termociclador y se somete al siguiente programa:

94° C X 4 min
94° C X 45 seg } 39 ciclos
58° C X 45 seg }
72° C X 45 seg }
72° C X 7 min
4° C X ∞



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

Código: F-ATR-AAT-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-ATR-AAT-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 TEJIDO VEGETAL DE BULBOS ORNAMENTALES DE EXPORTACIÓN

Código: D-ATR-AAT-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