



**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE  
BACTERIAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE  
EXPORTACIÓN**

**Código: D-GF-CGP-PT-042**

**Versión:01**

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL  
DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS  
EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE  
EXPORTACIÓN**

CONTENIDOS

<b>1 OBJETIVOS Y ALCANCE .....</b>	<b>3</b>
<b>2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS .....</b>	<b>3</b>
<b>3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS .....</b>	<b>4</b>
<b>4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN .....</b>	<b>4</b>
4.1 Requisitos de personal de laboratorio .....	4
4.1.1 Responsable técnico .....	4
4.1.2 Analistas .....	5
4.2 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos .....	5
4.2.1 Requisitos de infraestructura .....	5
4.2.2 Requisitos de Equipamiento .....	5
4.2.3 Requisitos de Materiales y Reactivos .....	6
4.3 Requisitos Específicos .....	7
4.4 Medios de verificación de requisitos .....	7
<b>5 ASPECTOS GENERALES DEL ANÁLISIS .....</b>	<b>8</b>
5.1 Designación del Laboratorio Autorizado .....	8
5.2 Captación y traslado de las muestras .....	8
5.3 Recepción y manejo de la muestra/contramuestra .....	9
5.3.1 Recepción de la muestra .....	9
5.3.2 Manejo de la contramuestra .....	9
5.4 Metodología de diagnóstico .....	9
5.5 Interpretación de Resultados .....	10
5.6 Esterilización y eliminación de material de desecho .....	10
5.7 Variación de la metodología .....	10
5.8 Registros .....	10
<b>6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>10</b>
<b>7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS.....</b>	<b>11</b>
<b>8 OBLIGACIONES.....</b>	<b>11</b>
<b>9 METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>12</b>
9.1 Esquema Análisis.....	12
9.2 Selección de la muestra .....	13
9.2.1 Semillas.....	13
9.2.2 Tejido Vegetal al estado fresco .....	14
9.3 Análisis .....	15
9.3.1 Aislamiento Semillas .....	16
9.3.2 Aislamiento a partir de Tejido Vegetal .....	17
9.3.3 Preparación de cultivos puros.....	18
9.3.4 PCR.....	18
9.3.4.1 Extracción de ADN .....	18
9.3.4.2 PCR con primers universales .....	19
9.3.4.2 PCR para la bacteria solicitada .....	19
9.3.5 Test bioquímicos y fisiológicos.....	20
9.3.5.1 Caracterización Morfológica .....	20
9.3.5.2 Utilización de los Compuestos Carbónicos .....	21
9.3.5.3 Producción de Sustancias Reductoras a partir de Sacarosa (SRS) .....	24
9.3.5.4 Producción de Lévano a partir de Sacarosa .....	24
9.3.5.5 Utilización de Compuestos Nitrogenados .....	25
9.3.5.6 Degradación de Macromoléculas.....	26
9.3.5.7 Otras Pruebas .....	27
9.3.6 Interpretación de Resultados .....	29
9.3.7 Formulación Tampones y Medios .....	29
<b>10 FORMULARIOS.....</b>	<b>30</b>

## 1 OBJETIVOS Y ALCANCE

El objetivo de este documento es establecer los requisitos y procedimientos que deberán cumplir los/as interesados/as que, voluntariamente, postulen ante el SAG, para obtener su autorización como laboratorio de análisis/ensayo para la ejecución del diagnóstico de bacterias fitopatógenas en material de propagación de exportación.

El alcance de la autorización es de carácter nacional y corresponderá al análisis todas las bacterias presentes en el territorio nacional, cuyo diagnóstico es solicitado por los distintos países de destino, según lo indicado en el siguiente listado:

- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Agrobacterium vitis*
- *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*
- *Dickeya zeae*
- *Erwinia carotovora subsp. carotovora*
- *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*
- *Pseudomonas cichorii*
- *Pseudomonas corrugata*
- *Pseudomonas marginalis pv. marginalis*
- *Pseudomonas mediterranea*
- *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola*
- *Pseudomonas syringae pv. coronafaciens*
- *Pseudomonas syringae pv. syringae*
- *Pseudomonas syringae pv. tagetis*
- *Pseudomonas syringae pv. tomato*
- *Xanthomonas arboricola pv. juglandis*
- *Ralstonia solanacearum raza 3 biovar 2*
- *Xanthomonas arboricola pv. corylina*
- *Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli*
- *Xanthomonas campestris pv. campestris*
- *Xanthomonas campestris pv. translucens*
- *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*

Sin perjuicio de lo anterior, en caso de que el Servicio lo requiera, podrá ampliar el listado de bacterias 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.

Asimismo, el presente documento indica los deberes y obligaciones que deben cumplir los laboratorios una vez que obtengan su autorización.

## 2 REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS

- Kurowski, C.; Remeus, P. 2007 Proposal for a new method for detecting *Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* on bean seeds. ISTA Method Validation Reports 4:1-12.
- Lloop, P.; Caruso, P.; Cubero, J.; Morente, C.; López, M.M. 1999 A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase Chain reaction. J. Microbiol. Meth. 37:23-31.

- Mkandawire, A. et al 2004 Genetic Diversity and Pathogenic Variation of Common Blight Bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) Suggests Pathogen Coevolution with the Common Bean. *Phytopathology* Vol. 94(6):593-603.
- Remeus, P.; Sheppard, J. 2006 Proposal for a new method for detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seeds. *ISTA Method Validation Reports* 3:1-11.
- Servicio Agrícola y Ganadero. 2012. Resolución Exenta del Director Nacional del SAG N° 529, del 30 de enero del 2012, que norma el Sistema Nacional de Autorización de Terceros.
- Servicio Agrícola y Ganadero. Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos, versión vigente.
- Servicio Agrícola y Ganadero. 2003 Resolución 3139 del 27 octubre del 2003.
- Schaad, N.W.; Jones, J.B.; Chun, W. 2001 Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition. APS PRESS. 2001. 373p.
- Tatjana, P. et al 2010 Detection and identification of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* on bean seed collected in Serbia. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 5(19):2730-2736.
- The International Seed Testing Association (ISTA) 2012 Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris*. En *International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7 Seed Health Testing Methods*. 7-021-1 al 7-021-16.
- The International Seed Testing Association (ISTA) 2012 Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* on *Phaseolus vulgaris*. En *International Rules for Seed Testing, Annexe to Chapter 7 Seed Health Testing Methods*. 7-023-1 al 7-023-13.

### 3 DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Servicio/SAG	Servicio Agrícola y Ganadero
SISVEG	Sistema de Información de Sanidad Vegetal.
Test bioquímicos	Serie de pruebas in vitro que permiten determinar características fenotípicas constantes de una bacteria.
DTyAT	Departamento de Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros

### 4 REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN

#### 4.1 Requisitos de personal de laboratorio

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

##### 4.1.1 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 deberá cumplir con los siguientes requerimientos:

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- 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 comprobable en el área de laboratorios de al menos dos (2) años.
- Tener competencia técnica o experiencia laboral de al menos 1 año comprobable en diagnósticos de fitopatología, bacteriología y técnicas moleculares.

#### **4.1.2 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 fitopatología, bacteriología y técnicas moleculares.

El laboratorio postulante, previendo una eventual ausencia del/la responsable técnico o del o los/las analistas, podrá postular a otras personas para que actúen en ausencia del o los/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.

## **4.2 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos**

### **4.2.1 Requisitos de infraestructura**

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

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

Las salas mínimas que se requieren para los análisis son:

- Sala de preparación de muestras
- Sala de lavado y esterilización
- Sala de aislamiento
- Sala de extracción de ADN
- Sala de amplificación y electroforesis.

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

### **4.2.2 Requisitos de Equipamiento**

El laboratorio postulante debe contar con los equipos necesarios, acordes al volumen de muestras, que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis a realizar. Deben

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

contar con su certificado de mantención y/o calibración al día, efectuado a lo menos una vez cada 2 años por una empresa pertinente y reconocida en el área y un programa de mantención y calibración de éstos de acuerdo a las necesidades y requerimientos del laboratorio.

A continuación, se detalla el equipamiento mínimo que se debe considerar al momento de realizar la postulación:

- Balanza analítica con una resolución de 0,001 gramo.
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl, o equivalente.
- Peachímetro.
- Agitador magnético.
- Freezer que alcance temperaturas de  $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$  o menores.
- Refrigerador que alcance una temperatura de  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Conservadora de muestras que alcance una temperatura de  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Autoclave para esterilización de material.
- Autoclave para esterilización de tampones y material limpio.
- Cámara de flujo laminar o gabinete de bioseguridad Clase II.
- Micro-Centrífuga (hasta 14000 r.p.m.).
- Baño de agua termoregulado.
- Agitador de tubos o Vortex.
- Termociclador para PCR convencional.
- Fuente de poder.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Transiluminador UV.
- Sistema fotográfico para registro de geles.
- Campana extracción de gases.
- Estufa de incubación a  $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- Lámpara UV.
- Agitador orbital, de preferencia refrigerado.

#### **4.2.3 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.

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

##### Generales de laboratorio:

- Bolsas plásticas transparentes, selladas de fondo, de 200 micras de densidad.
- Etanol 95%, Hipoclorito de sodio y Agua destilada.
- Controles positivos de referencia.
- Puntas para micropipetas con y sin filtro.

##### Aislamiento:

- Placas de 90 mm. de diámetro (plásticas o de vidrio Petri).
- Tampón AFT. Medios de Cultivo B de King y Medio de Cultivo MT.
- Reactivos y materiales para pruebas LOPAT.
- Mechero, Rastrillo siembra y Asa de platino.
- Tubos de ensayo con tapa.
- Bisturí y hojas de bisturí.
- Guantes de látex.

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- Reactivos para test bioquímicos.

#### PCR convencional:

- Isopropanol.
- Tampón extracción ADN y Tampón AFT.
- dNTP's, taq polimersa platinum o similar, partidores específicos.
- Tubos de PCR de 0,2 mL y eppendorf de 1,5ml libres de nucleasas.
- Marcador de peso molecular 50 y 100 pb.
- Agua Libre de nucleasas y Buffer TAE (Tris- acetato-EDTA).
- Gel red y Agarosa grado molecular.

### **4.3 Requisitos Específicos**

A esta autorización podrán postular los terceros que deseen ejecutar directamente las labores relacionadas con el proceso de diagnóstico, debiendo cumplir con los siguientes 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 describan 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 Instructivos Técnicos para cada bacteria, describiendo el tipo de material vegetal a analizar y la técnica de análisis a utilizar para la ejecución del diagnóstico de las bacterias fitopatógenas que están dentro del alcance de la autorización. Se debe indicar la metodología para cada tipo de material vegetal o sustrato a analizar.
- El laboratorio deberá contar con timbres en que consigne el nombre del laboratorio para ser utilizados en el marco de la autorización.

### **4.4 Medios de verificación de requisitos**

De acuerdo a lo dispuesto en el numeral 6 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos, los/las interesados en ser autorizados para realizar el diagnóstico de bacterias fitopatógenas en material de propagación de exportación, deben presentar, junto a la solicitud de autorización (F-GF-CGP-PT-068), los antecedentes que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos técnicos establecidos por el SAG:

- Los antecedentes generales del laboratorio que se establecen en el numeral 6.1 del Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos (dossier legal y antecedentes generales).
- Formulario de identificación del responsable técnico (F-GF-CGP-PT-069), según formato establecido en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.
- Certificado de título del responsable técnico identificado en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- Documentos que garanticen la competencia técnica y/o experiencia laboral del/la responsable técnico en las áreas de fitopatología, bacteriología y/o técnicas moleculares según corresponda.
- Formulario de identificación de los analistas (F-GF-CGP-PT-113), según formato establecido en el presente documento.
- Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificados en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
- Documentos que acrediten la competencia técnica y/o experiencia laboral de los/las analistas en las áreas de fitopatología, bacteriología y/o técnicas moleculares según corresponda.
- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos.
- Listado de equipos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio y capacidad cuando corresponda.
- Lista de materiales, reactivos y material de referencia requeridos para el diagnóstico.
- Manual de procedimientos del laboratorio e Instructivos técnicos para cada bacteria que solicite autorizar.

## **5 ASPECTOS GENERALES DEL ANÁLISIS**

### **5.1 Designación del Laboratorio Autorizado**

El productor deberá designar un Laboratorio Autorizado, el cual prestará los servicios de análisis bacteriológico, para ello, deberá declarar al Servicio el nombre del laboratorio autorizado, mediante el Formulario F-GF-CGP-PT-179 "Declaración Jurada para la Designación del Laboratorio Autorizado que prestará Servicios de Análisis Bacteriológico", establecido en este Instructivo. Este registro deberá enviarse en forma electrónica, al menos con 1 (un) mes de anticipación, al/la encargado/a de la Sección MAPRO del Subdepartamento de Certificación Fitosanitaria de Exportación, Unidad que publicará en intranet el listado actualizado de laboratorios determinados por cada productor. En caso de no contar con la dirección de correo electrónico, ésta puede ser solicitada en [oficina.informaciones@sag.gob.cl](mailto:oficina.informaciones@sag.gob.cl).

### **5.2 Captación y traslado de las muestras**

El muestreo será realizado por personal del SAG, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Servicio, por lo tanto, no es una actividad de competencia de los laboratorios autorizados en esta categoría.

Las muestras serán dispuestas en una bolsa de plástico resistente a la manipulación y el transporte, asimismo, serán selladas con huincha con sello SAG.

Las muestras, previo a su envío, deben ser ingresadas al Sistema de Información de Sanidad Vegetal (SISVEG) u otro sistema informático que el Servicio determine y el código de barra que se genera, será adjuntado a cada muestra.

El envío de las muestras será de responsabilidad del personal SAG a cargo del muestreo, sin perjuicio de lo anterior, el Servicio podrá utilizar los servicios de una empresa de transporte de encomiendas o courier, reconocida a nivel nacional, establecida legalmente y 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 de las muestras. El costo del envío será asumido por el laboratorio autorizado.



	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b>  <b>Versión:01</b>
--	---	---

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

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

#### 5.3.1 Recepción de la muestra

El laboratorio autorizado deberá informar por escrito (vía correo electrónico u otra metodología previamente definida) 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 de las muestras en el laboratorio.

Las muestras, deben ser recibidas en el Laboratorio Autorizado acompañadas de un documento que contenga como mínimo, la siguiente información:

- Nombre del Productor
- Detalle de los Folios SISVEG
- Oficina SAG que realizó el muestreo y fecha del muestreo

El responsable técnico del laboratorio deberá verificar, adicionalmente, la aptitud de la muestra para el análisis, considerándose como muestra apta, aquella que no presente signos evidentes de haber sido tratada con algún tipo de producto químico, se encuentre en condiciones adecuadas de hidratación, corresponda al estado fenológico adecuado y al tipo y tamaño de muestra determinado en los procedimientos establecidos por el Servicio. Si la muestra presenta condiciones de embalaje inadecuadas o no fuera apta para el análisis, debe ser rechazada. Ante esta situación, el responsable técnico debe avisar por escrito, de manera simultánea, a la oficina SAG correspondiente al origen de la muestra y al encargado de supervisión SAG de este laboratorio, indicando N° de Folio del protocolo y él o los números correlativos de las muestras en un plazo de 2 (dos) días corrido desde la recepción de las muestras.

Una vez que el laboratorio autorizado haya verificado lo anterior y haya determinado que las muestras son aptas para análisis, debe aceptarlas e ingresarlas al sistema SISVEG en el módulo laboratorio/recepción de muestras u en otro sistema informático que el SAG determine en el futuro. El plazo para recibir la muestra en el sistema no debe superar los 3 (tres) días, contados desde la fecha de muestreo.

#### 5.3.2 Manejo de la contramuestra

En caso de semillas, el material no utilizado en los análisis, debe ser almacenado, identificado, y protegido de la radiación solar directa, alta temperatura o alta humedad.

Para tejido vegetal, se considerará como contramuestra el tejido seleccionado para el análisis, mantenido en tampón de extracción de bacterias a una temperatura inferior a los -15°C,

En ambos casos, el periodo mínimo de mantención de la contramuestra será de seis (6) meses.

### 5.4 Metodología de diagnóstico

Para determinar la ausencia o presencia de las bacterias fitopatógenas solicitadas, se procederá a desarrollar la metodología de análisis, de acuerdo a la plaga requerida, la cual debe ser ingresada en el SISVEG. La metodología de análisis se describe en el numeral 9 del presente instructivo.

 <p>SAG Ministerio de Agricultura  Gobierno de Chile</p>	<p><b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b></p>	<p>Código: D-GF-CGP-PT-042 Versión:01</p>
--	--	---

### 5.5 Interpretación de Resultados

El cálculo y expresión de resultados para la metodología de diagnóstico y los lineamientos para considerar una muestra positiva o negativa, están indicados en el numeral 9 del presente instructivo.

### 5.6 Esterilización y eliminación de material de desecho

Todo material de laboratorio utilizado en las diferentes etapas de la metodología de diagnóstico debe ser esterilizado mediante autoclavado.

El material que no se pueda reutilizar, debe ser autoclavado y desechado a la basura normal. El proceso de autoclavado debe ser controlado mediante cintas de esterilización y termómetro de máxima, instalado al interior de la autoclave. Además, el proceso debe ser verificado en forma periódica mediante control biológico de esterilidad de autoclave.

El material vegetal de descarte, o el correspondiente a contramuestras negativas para eliminar, puede ser eliminado directamente a la basura normal o bien devuelto al interesado si este así lo requiriera.

El material vegetal correspondiente a contramuestras positivas para eliminar, debe ser desechado en bolsas claramente identificadas, para su posterior incineración o autoclavado.

### 5.7 Variación de la metodología

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 evaluadas y aprobadas podrán ser implementadas por los laboratorios autorizados.

### 5.8 Registros

El laboratorio debe mantener por al menos dos años los siguientes registros:

- Registro de temperatura, para cada equipo de frío. Considerar en el caso de los refrigeradores, al freezer como equipo aparte.
- Registro de verificación de termómetros.
- Registro de autoclavado, que considere temperaturas y tiempos.
- Registro control biológico de la autoclave.
- Registro de mantención de equipos.
- Registro de materiales enviados a incineración.
- Registros de resultados de PCR.

## 6 REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos del análisis de muestras serán informados a través del SISVEG u otro sistema informático que el SAG determine en el futuro, indicando positivo o negativo para cada bacteria según corresponda. El plazo máximo establecido para el ingreso de los resultados al SISVEG será de ocho (8) días hábiles, contados desde la fecha de recepción de las muestras por parte del laboratorio autorizado. El SAG podrá determinar un canal paralelo de entrega de resultados en caso que sea considerado necesario.

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

Cualquier atraso en el tiempo de respuesta, deberá ser informado por el responsable técnico del laboratorio autorizado, con dos (2) días hábiles de anticipación a la fecha límite de respuesta, vía correo electrónico, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio y a la oficina que tomó la muestra.

La autorización de resultados en el sistema, debe realizarla el responsable técnico, quien los dejará disponibles para el sistema en caso de ser negativos, o en calidad de Reservados, en caso de ser positivos a las bacterias solicitadas.

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

## **7 SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS**

Todo laboratorio autorizado será supervisado, 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 lo siguiente:

- El envío de contramuestras, ya sea semillas y/o cepas, para ser analizados oficialmente 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.
- Analizar un set de muestras, tanto positivas como negativas, para verificar la conducción del ensayo. Los resultados de este set de muestras debe coincidir en al menos un 90% para las muestras positivas, de no ser así, el laboratorio quedaría suspendido momentáneamente mientras se realiza un segundo set de muestras ciegas, el cual dependiendo de sus resultados, puede levantar la suspensión momentánea o pasarla a definitiva si nuevamente los resultados de las muestras positivas no coinciden en al menos un 90%.

## **8 OBLIGACIONES**

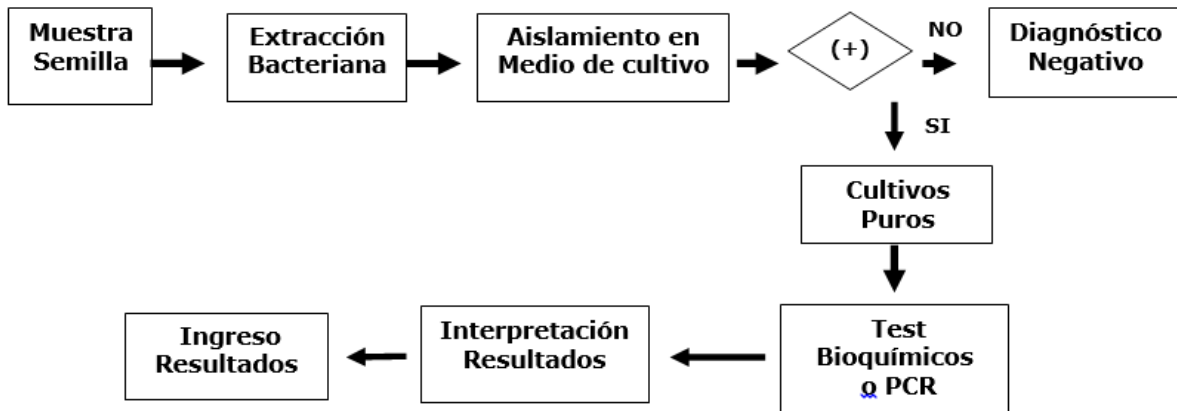
Sin perjuicio de las obligaciones estipuladas en el capítulo 7 del Reglamento específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos vigentes, el laboratorio autorizado deberá cumplir con lo siguiente:

- No podrá ejercer como laboratorio autorizado cuando el representante legal, socios, directores, accionistas, gerentes, responsable técnico o analistas tengan un interés directo con la actividad para la cual el laboratorio está postulando u otras que determine el Servicio.

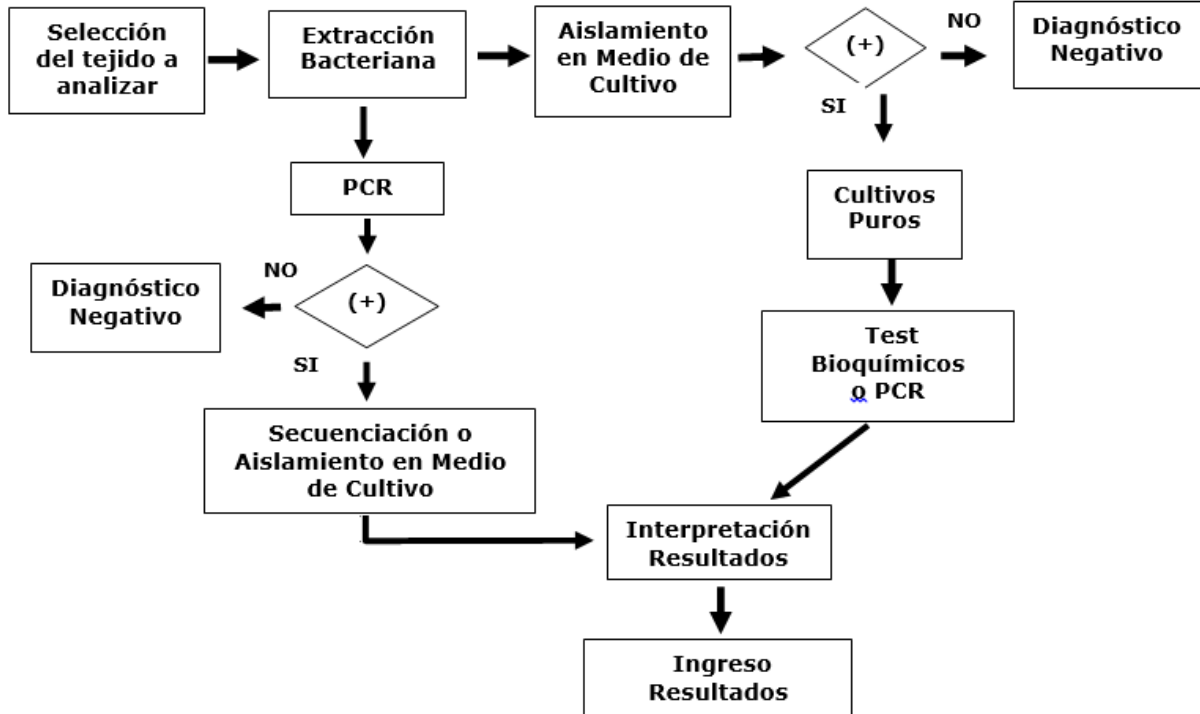
## 9 METODOLOGÍA DE DIAGNÓSTICO

### 9.1 Esquema Análisis

Para semillas el esquema de análisis es el siguiente:



Para tejido vegetal, el esquema de análisis es el siguiente:



## 9.2 Selección de la muestra

### 9.2.1 Semillas

A continuación, a modo de referencia, para determinar si la cantidad de muestra de semilla recibida en el laboratorio, es apta o no, se indica el peso de la muestra que deben considerar los Inspectores para enviar al laboratorio:

<b>Nombre Común</b>	<b>Nombre Científico</b>	<b>Peso muestra envío al laboratorio (g)</b>
Acelga	<i>Beta vulgaris L.</i>	500
Ají, Pimentón	<i>Capsicum spp.</i>	150
Avena	<i>Avena sativa L.</i>	1000
Berenjena	<i>Solanum melongena L.</i>	150
Brócoli	<i>B.oleracea var.italica</i>	100
Calabaza	<i>Cucurbita moschata</i>	350
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	1000
Centeno	<i>Secale cereale</i>	1000
Col forrajera	<i>B.oleracea var. Acephala</i>	100
Coliflor	<i>B.oleracea var. Botrytis</i>	100
Frejol	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1500
Lechuga	<i>Lactuca sativa</i>	30
Maíz	<i>Zea mays</i>	1000
Maravilla	<i>Helianthus annuus</i>	1000
Melón	<i>Cucumis melo</i>	150
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>	150
Poroto soya	<i>Glycine max</i>	1000
Repollo	<i>B.oleracea var. capitata</i>	100
Repollo Bruselas	<i>B.oleracea var. Gemnifera</i>	100
Sandía	<i>Citrullus lanatus</i>	1000
Tomate	<i>Tomate Lycopersicon esculentum</i>	25
Trébol alejandrino	<i>Trifolium alexandrinum</i>	60
Trébol blanco	<i>Trifolium repens</i>	25
Trébol encarnado	<i>Trifolium incarnatum</i>	80
Trébol frutilla	<i>Trifolium fragiferum</i>	40
Trébol híbrido	<i>Trifolium hybridum</i>	25
Trébol rosado	<i>Trifolium pratense</i>	50
Trébol subterráneo	<i>Trifolium subterraneum</i>	250
Zanahoria	<i>Daucus carota</i>	30
Zapallo	<i>Cucurbita maxima</i>	1000
Zapallo italiano	<i>Cucurbita pepo</i>	1000

### 9.2.2 Tejido Vegetal al estado fresco

Seleccionar el tejido a analizar teniendo como base la ficha de cada plaga, considerando las siguientes indicaciones:

- En caso de enfermedades vasculares, de preferencia seleccionar la zona de avance de la lesión. En caso de no observar síntomas, seleccionar el tejido más susceptible de daño.
- En casos de lesiones o manchas foliares o de frutos, seleccionar la mancha completa.
- En caso de canchales o agallas, seleccionar la zona de avance de la lesión. Si es incipiente tomar el canchaleo o agalla completa.

El tejido a analizar, de acuerdo a la bacteria solicitada, es el siguiente:

<b>Bacteria</b>	<b>Tejido a Analizar</b>
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Manchas (foliar, vaina, tallo)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Manchas (foliar, vaina, tallo)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	Manchas (foliar, vaina, tallo)
<i>Dickeya zeae</i>	Zona de avance de la lesión o cuello de la planta.
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	Manchas (foliar y tallo)
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	Zona avance de la lesión (Pie negro, pudrición blanda o marchitez).
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>	Zona avance de la lesión (Pie negro, pudrición blanda o marchitez).
<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	Zona avance de la lesión (pudrición blanda) o cuello de la planta.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Manchas foliar o en V y/o en caso de daño vascular, zona avance de la lesión o cuello de la planta.
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Mancha foliar y/o en caso de daño vascular, zona avance de la lesión o cuello de la planta.
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	Manchas (foliar, inflorescencia, tallo)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>translucens</i>	Manchas (foliar, inflorescencia, tallo)
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Manchas (foliar, fruto, tallo)
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Zona de avance de la lesión o nudos de la planta
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Manchas (foliar, fruto, tallo)
<i>Ralstonia solanacearum</i> raza 3 biovar 2	Zona avance de la lesión o cuello de la planta.
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	Zona avance de la lesión o cuello de la planta.

<i>Pseudomonas corrugata</i>	Zona avance de la lesión o cuello de la planta.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Zona de la agalla o raíces de la planta
<i>Agrobacterium vitis</i>	Zona de la agalla o injerto de la planta
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Zona raíces de la planta
<i>Xanthomonas arboricola pv. juglandis</i>	Manchas (foliar, fruto, ramilla) o yemas asintomáticas.
<i>Xanthomonas arboricola pv. corylina</i>	Manchas (foliar, fruto, ramilla) o yemas asintomáticas.

### 9.3 Análisis

Las técnicas de análisis recomendadas son:

<b>Bacteria</b>	<b>Técnica Análisis</b>
<i>Pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Dickeya zeae</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Pseudomonas syringae pv. tagetis</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Erwinia carotovora subsp. atroseptica</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Pseudomonas marginalis pv. marginalis</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Pseudomonas cichorii</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Pseudomonas syringae pv. coronafaciens</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Xanthomonas campestris pv. translucens</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.

Bacteria	Técnica Análisis
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Ralstonia solanacearum</i> raza 3 biovar 2	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Pseudomonas corrugata</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Agrobacterium vitis</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	Medios de cultivos. Confirmación por PCR.
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>corylina</i>	Medios de cultivos. Confirmación por test bioquímicos.

### 9.3.1 Aislamiento Semillas

Primero se debe preparar la muestra, para ello se pesan algunas semillas, se cuentan, y se calcula el TSW (peso de 1.000 semillas) de acuerdo a la siguiente formula:

$$TSW = (\text{Peso de la semilla} / \text{N}^{\circ} \text{ de semillas}) \times 1000$$

Para el caso de semillas pequeñas (tomate, pimentón, coliflor, repollo, zanahoria, entre otras) la cantidad a utilizar son 10.000 semillas en 100ml de tampón AFT+0,2ml/lit de tween 20, pre enfriado a aproximadamente 4°C.

Para semillas medianas (maíz, frejol, arveja, sandía, melón, cereales, entre otras) la cantidad a utilizar son 1.000 semillas en 1.000ml de tampón AFT+0,2ml/lit de tween 20, pre enfriado a aproximadamente 4°C.

Ya para semillas mayores tales como zapallo, la cantidad a utilizar son 500 semillas en 1.000ml de tampón AFT+0,2ml/lit de tween 20, pre enfriado a aproximadamente 4°C.

### Procedimiento:



- Colocar en agitación 100-125rpm/1hora a aproximadamente 4°C. Verificar pH 6.8 a 7 mediante papel pH estéril. En caso de ser mayor o menor a este rango, llevar a pH mediante HCl o NaPH, según sea el caso.
- Dejar 18hrs o toda la noche a aproximadamente 4°C. Idealmente mantener la agitación durante todo este proceso.
- Agitar por mano por unos segundos y luego dejar en agitación 100-125rpm/10min a aproximadamente 4°C.
- Tomar 1ml de la suspensión y llevar a tubo de ensayo con 9ml de AFT. Agitar mediante vortex y proceder a realizar diluciones seriadas a la -1, -2, -3 y -4.
- Sembrar 100µlt mediante rastrillo en MT, en caso de *Xanthomonas*; KB, en caso de *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Agrobacterium*; y CVP, en caso de *Erwinias*, dos placas por dilución y el directo.
- Idealmente, sembrar en paralelo controles positivos de la bacteria a analizar.
- Incubar a 27-28°C por 72 horas.
- Verificar la presencia de bacterias sospechosas y, en caso de determinar su presencia, realizar cultivos puros.
- Para *Xanthomonas* y *Clavibacter*, en caso de no verificar colonias sospechosas volver a incubar por 72hrs más.
- Realizar pruebas complementarias de ser necesario.

### 9.3.2 Aislamiento a partir de Tejido Vegetal

- Tomar los trozos de tejidos, colocar en bolsa de alta densidad y moler mediante martillo, idealmente de madera.
- Agregar tampón AFT en proporción 1:4 (g muestra: ml tampón).
- Dejar a ±4°C por 15-30 minutos a 150-200rpm.
- Tomar 1ml de la suspensión y llevar a tubo de ensayo con 9ml de AFT. Agitar mediante vortex y proceder a realizar diluciones seriadas a la -1, -2 y -3.
- Sembrar 100µlt mediante rastrillo en MT, en caso de *Xanthomonas*; KB, en caso de *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Agrobacterium*; y CVP, en caso de *Erwinias*, dos placas por dilución.
- Idealmente, sembrar en paralelo controles positivos de la bacteria a analizar.
- Incubar a 27-28°C por 72 horas.
- Verificar la presencia de bacterias sospechosas y, en caso de determinar su presencia, realizar cultivos puros.
- Para *Xanthomonas* y *Clavibacter*, en caso de no verificar colonias sospechosas volver a incubar por 72 horas más.
- Realizar pruebas complementarias de ser necesario.

### Variaciones de la técnica

- Si la bacteria que se desea analizar requiere una temperatura óptima de crecimiento distinta a los 27°C las placas deben incubarse en otra estufa que cumpla con la condición requerida.
- En caso de muestras puntuales que no requieran dilución seriada, la siembra puede ser realizada mediante asa de siembra para 10µl.
- En caso de material asintomático se procede a extraer tejido desde la zona donde es factible localizar el patógeno, el cual se encuentra en baja proporción o en condición de latencia.
- Para material vegetal que requiere verificar presencia o ausencia de una bacteria en forma epífita, se seleccionan los tejidos al lado de mechero, se colocan en una bolsa, se agrega

tampón AFT en proporción 1:10 (g muestra: ml tampón), se agita con hielo en agitador orbital a 100rpm por una hora y se procede a realizar las diluciones seriadas.

### 9.3.3 Preparación de cultivos puros

A partir de las colonias de crecimiento característico, obtenidas en el punto anterior, se procede a realizar cultivos puros con el fin de multiplicar la bacteria. Estos cultivos puros se utilizarán en las pruebas complementarias.

Los pasos a seguir para realizar cultivos puros son:

- Seleccionar colonias sospechosas.
- Traspasar las colonias sospechosas a medio B de King.
- Incubar a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

### 9.3.4 PCR

#### 9.3.4.1 Extracción de ADN

Pueden utilizarse diferentes kits comerciales de extracción de ADN de bacterias que existen en el mercado, así como otros procedimientos descritos en la literatura científica, que aseguren una extracción de calidad y confiable.

No obstante lo anterior y de acuerdo a los buenos resultados obtenidos, a continuación se detalla el procedimiento sugerido.

#### a) Para aislados provenientes de cultivos puros

Los aislados deben provenir de cultivos puros.

- Colocar 1ml de agua destilada en un vial y agregar asadas del cultivo puro en medio King B.
- Calentar durante 4min a  $100^{\circ}\text{C}$  y colocar inmediatamente en hielo.
- Almacenar a  $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### b) Para tejido vegetal

Metodología utilizada para extraer DNA bacteriano de material vegetal lignificado o no lignificado para la detección de bacterias no fastidiosas.

#### Operatoria

- Moler el tejido vegetal en bolsa de maceración con AFT.
- Recuperar 1.5ml y centrifugar a 13000rpm/10min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 $\mu\text{l}$  de tampón de extracción de ADN.
- Agitar mediante vortex y mantener en agitación durante 1hora a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 5.000rpm/5min.
- Tomar 450  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y colocar en un nuevo tubo.
- Agregar igual volumen de isopropanol. Invertir varias veces y dejar 1 hora a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13.000rpm/5min.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente.
- Resuspender el pellet en 200  $\mu\text{l}$  de agua.

### 9.3.4.2 PCR con primers universales

En primer lugar se debe verificar que la extracción de ADN fue correctamente realizada, para ello se utilizan primer universales para Eucariotas. Esta etapa solo se realiza si la extracción de ADN proviene de tejido vegetal.

Este PCR se realiza para verificar que la extracción de ADN total está correcta.

- Se sugiere utilizar los primers universales 28Sf (CCC TGT TGA GCT TGA CTC TAG TCT GGC) y 28Sr (AAG AGC CGA CAT CGA AGG ATC).
- Preparar el gel de electroforesis disolviendo, en tampón TAE, agarosa al 2% y agregando gel red a una concentración aproximada de 0,005%.
- En primer lugar se deben examinar los controles negativos, los cuales no deberán presentar bandas. Si hay presencia de bandas de amplificación se debe repetir el proceso de amplificación.
- Una vez verificados los controles se observa en los carriles de las muestras la presencia o ausencia de bandas de amplificación de aprox. 600bp.
- La ausencia de banda de amplificación en cualquier muestra determina que se debe repetir la extracción para esa muestra.
- La presencia de banda determina el PCR positivo, permitiendo continuar con el proceso de análisis.
- Ingresar los correlativos de las muestras en el registro de PCR, adjuntando el registro fotográfico.

### 9.3.4.2 PCR para la bacteria solicitada

En el caso de extracción de tejido vegetal, esta etapa del análisis está condicionada a si el PCR de ADN total de la muestra dio positivo, con los partidores universales.

- La amplificación del ADN se realiza utilizando el par de primers específico para la bacteria solicitada.
- Proceder a realizar la electroforesis, con el fin de visualizar si hubo amplificación de muestras y controles. Proceder de acuerdo a lo descrito en el punto 9.3.4.2.
- Una vez verificados los controles se observa en los carriles de las muestras la presencia o ausencia de bandas de amplificación.
- La presencia de banda a la altura correcta, determina el PCR positivo.
- Ingresar los correlativos de las muestras en el registro de PCR, adjuntando el registro fotográfico.

Las secuencias de primers sugeridas son las siguientes:

Bacteria	Primers	Secuencia
<i>Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli</i>	X4c	GGC AAC ACC CGA TCC CTA AAC AGG
	X4e	CGC CCG GAA GCA CGA TCC TCG AAG
<i>Dickeya zeae</i>	ADE1	GAT CAG AAA GCC CGC AGC CAG AT
	ADE2	CTG TGG CCG ATC AGG ATG GTT TTG TCG TGC

Bacteria	Primers	Secuencia
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Zup2309	AAA TCA GGG GGA TGC GGT GG
	Zup2310	TCC GGC CAG GGT CGA TAC AGT G
	DLH 120	CCG TAG CAC TTA GTG CAA TG
	DLH 125	GCA TTT CCA TCG GTC ACG ATT G
<i>Pseudomonas cichorii</i>	PcichF2	GCG GTG ATT GTC GGT GTC ATC AC
	PcichR1	ATT CGC TGA CTT CCT TGA ACG GGA G
<i>Ralstonia solanacearum</i>	OLI-1	GGG GGT AGC TTG CTA CCT GCC
	Y-2	CCC ACT GCT GCC TCC CGT AGG AGT
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	PC5/1	CCA CAG GAC AAC ATG TCC AC
	PC5/2	CAG GCG CTT TCT GGA ACA TG
<i>Pseudomonas corrugata</i>	PC1/1	GGA TAT GAG CCA GGT CTT CG
	PC1/2	CGC TCA AGC GCG ACT TCA G

### 9.3.5 Test bioquímicos y fisiológicos

Para determinar los test bioquímicos y fisiológicos a realizar, se debe acudir a las tablas de resultados a estos test, disponibles en la literatura. Se sugiere como referencia las tablas del Schaad, 2001.

Los test bioquímicos más frecuentemente utilizados se describen en los numerales 9.3.5.1 al 9.3.5.7.

#### 9.3.5.1 Caracterización Morfológica

##### a) Tinción de Gram

Técnica de tinción diferencial que refleja diferencias fundamentales biofísicas y bioquímicas existentes en las paredes celulares bacterianas y permite su división en dos grupos: aquellas que se decoloran totalmente por la acción del alcohol (Gram negativo) y las que guardan coloración después de un corto lavado con alcohol (Gram positivo). El método que se describe es la modificación de Hucher y Doetsch, 1981.

##### Operatoria

- Preparar la solución de violeta cristal. Disolver en forma separada en vasos de precipitado de 250ml 2g de violeta cristal en 20ml de etanol 95% y 0,8g de oxalato amónico en 80ml de agua destilada. Mezclar ambas soluciones y almacenar a temperatura ambiente en gotario.
- Preparar la solución de lugol. Triturar en un mortero 1g de yodo y 2g de ioduro de potasio. Añadir agua destilada poco a poco y continuar triturando hasta que se disuelvan los productos. Pasar la solución a frasco oscuro de 500ml y completar hasta 300ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.
- Preparar la solución de safranina para contraste. Disolver 2,5g de safranina O en 100 ml de etanol 95%. Pasar la solución a frasco con tapa de 250ml. En el momento de empleo diluir a 1/10.
- Depositar en un portaobjetos limpio una gota de suspensión bacteriana preparada a partir de un cultivo puro de 24-48hrs y dejar secar al aire.

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- Pasar la parte inferior del portaobjetos por una llama para fijar.
- Cubrir el portaobjetos con solución de violeta cristal por 1min.
- Lavar brevemente con agua corriente.
- Cubrir con la solución de lugol por 1min.
- Lavar con agua y escurrir.
- Decolorar con etanol 95% añadiendo el alcohol hasta que no se observe colorante en las gotas que caen al portaobjetos.
- Lavar con agua corriente y secar al aire.
- Cubrir con solución de safranina por 10seg.
- Lavar con agua corriente y secar al aire.
- Observar al microscopio. La bacteria Gram positiva aparece azul-violeta, mientras que la Gram negativa se tiñe de rosa-rojo.

#### **b) Solubilidad en KOH**

Este test de solubilidad es una alternativa a la tinción de Gram, especialmente en aquellos casos cuya interpretación es dudosa.

#### **Operatoria**

- Depositar en un portaobjetos limpio un par de gotas de KOH al 3%.
- Tomar con un asa de siembra colonias de un cultivo puro de 24-48hrs.
- Introducir las en las gotas de KOH y mezclarlas por 5-10seg.
- Separar lentamente el asa de la suspensión bacteriana.
- Si la solución se ha vuelto viscosa al separar el asa se formará un pequeño filamento; esta reacción se corresponde con bacterias Gram negativas.
- En caso contrario, el asa se eleva limpiamente y ello es característico de bacterias Gram positivas.

### **9.3.5.2 Utilización de los Compuestos Carbónicos**

#### **a) Metabolismo Respiratorio**

El medio de cultivo a utilizar es el de Hugh y Leifson, el cual es el más aconsejable para determinar el metabolismo oxidativo y fermentativo de las bacterias en el proceso de degradación de la glucosa. La degradación se ensaya tanto en condiciones aerobias como anaerobias y el catabolismo de la glucosa a ácido se manifiesta por un viraje a amarillo del indicador de pH azul de bromotimol.

#### **Operatoria**

- Pesar 2g de bactotripton; 5g de cloruro sódico; 0,3g de fosfato bipotásico; 5g de agar; 10g de glucosa y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 40ml de azul bromotimol (0,2%) y 700ml de agua destilada.
- Agitar y entibiar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Ajustar el pH 6,7-6,8 y observar un color verdoso-azulado.
- Repartir en tubos de 5ml.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Inocular en duplicado por picadura, cubriendo uno de los tubos con 5ml de vaselina estéril para crear condiciones de crecimiento anaeróbicas.
- Incubar en estufa a 27°C por 72hrs.
- Si el metabolismo bacteriano es fermentativo ambos tubos viran a amarillo.

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- Si el metabolismo bacteriano es oxidativo el tubo con vaselina se mantiene verde y el sin vaselina vira a amarillo.

### **b) Acidificación y Alcalinización a partir de HC y AO (Hidratos de Carbono y Ácidos Orgánicos)**

Este tipo de pruebas permite establecer caracteres diferenciales de las bacterias a través de la utilización de determinados hidratos de carbono y/o ácidos orgánicos. El resultado se observa por la acidificación o alcalinización del medio de cultivo utilizado.

#### **Metodología a seguir con *Pseudomonas* no fluorescentes**

Esta metodología se aplica a las bacterianas del género *Pseudomonas* que no son fluorescentes en el medio King B.

#### **Operatoria**

- Pesar 1g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 0,2g de KCl; 0,2g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 1ml de azul bromotimol (solución alcohólica al 0,2%) y 700ml de agua destilada.
- Agitar y entibiar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Ajustar el pH a 7.
- Repartir de a 90ml en frascos de 250ml.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Preparar 10ml de soluciones acuosas al 0,1% de los carbohidratos y esterilizarlas por filtración.
- Cuando el medio base esté a una temperatura de 40-50°C añadir bajo gabinete de bioseguridad 10ml de la solución de carbohidratos filtrados.
- Distribuir en tubos de ensayo de 5ml cada uno.
- Inocular con una gota de suspensión acuosa bacteriana proveniente de un cultivo puro de 24-48hr.
- Incubar en estufa de cultivo a 27°C.
- Observar a los 3, 7, 14 y 21 días.
- Se considera como reacción positiva cuando ocurre el viraje a amarillo del color verde del medio.
- Se considera como reacción negativa cuando no ocurre el viraje del medio y se mantiene el color verde.

#### **Metodología a seguir con *Pseudomonas* fluorescentes**

Esta metodología se aplica a las bacterianas del género *Pseudomonas* que son fluorescentes en el medio King B.

#### **Operatoria**

- Pesar 1g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 0,2g de KCl; 0,2g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 12g de agar y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 1ml de azul bromotimol (solución alcohólica al 0,2%) y 700ml de agua destilada.
- Agitar y entibiar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Ajustar el pH 7-7,2.
- Repartir de a 90ml en frascos de 250ml.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

- Preparar 10ml de soluciones acuosas al 0,1% de los carbohidratos y esterilizarlas por filtración.
- Cuando el medio base esté a una temperatura de 40-50°C añadir bajo gabinete de bioseguridad 10ml de la solución de carbohidratos filtrados.
- Distribuir en tubos de ensayo de 5ml cada uno.
- Inocular por picadura, además de los tubos con carbohidratos, un tubo con el medio base solo, con una asada de bacterias provenientes de un cultivo puro de 24-48hr.
- Incubar en estufa de cultivo a 27°C.
- Observar a los 3, 7, 14 y 21 días.
- Se considera como reacción positiva cuando ocurre el viraje a amarillo del color verde del medio.
- Se considera como reacción negativa cuando no ocurre el viraje del medio y se mantiene el color verde.

### **Metodología a seguir con *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2**

Este medio se utiliza para diferenciar los cuatro biovares de la bacteria *Ralstonia solanacearum*.

#### **Operatoria**

- Preparar el medio base de Hayward pesando 1g de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 0,2g de KCl; 0,2g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1g de peptona; 1,5g de agar oxoid N° 3 y colocándolos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 1ml de azul bromotimol (solución alcohólica al 1%) y 700ml de agua destilada.
- Agitar y entibiar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar y ajustar el pH a 7,1.
- Repartir de a 90ml en frascos de 250ml.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Preparar 10ml de soluciones acuosas al 0,1% de los carbohidratos y esterilizarlas por filtración.
- Cuando el medio base esté a una temperatura de 40-50°C añadir bajo gabinete de bioseguridad 10ml de la solución de carbohidratos filtrados.
- Distribuir en tubos de ensayo de 5ml cada uno.
- Inocular por picadura, además de los tubos con carbohidratos, un tubo con el medio base solo, con una asada de bacterias provenientes de un cultivo puro de 24-48hr.
- Incubar en estufa de cultivo a 30°C y observar a los 14 días.
- Se considera como reacción positiva cuando ocurre el viraje a amarillo del color verde del medio.
- Se considera como reacción negativa cuando no ocurre el viraje del medio y se mantiene el color verde.

### **Metodología a seguir con el género *Erwinia* spp.**

Este medio se utiliza para diferenciar las distintas subespecies del género *Erwinia*.

#### **Operatoria**

- Pesar 10gr de peptona y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 0,7ml de púrpura de bromocresol (solución alcohólica al 1,5%) y 700ml de agua destilada.
- Agitar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Ajustar el pH a 6,8.
- Repartir de a 90ml en frascos de 250ml.



	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Preparar 10ml de soluciones acuosas al 1% de los carbohidratos y esterilizarlas por filtración.
- Cuando el medio base esté a una temperatura de 40-50°C añadir bajo gabinete de bioseguridad 10ml de la solución de carbohidratos filtrados.
- Distribuir en tubos de ensayo de 5ml cada uno.
- Inocular con una gota de suspensión acuosa bacteriana proveniente de un cultivo puro de 24-48hr.
- Incubar en estufa de cultivo a 27°C y observar a los 7 días.
- Se considera como reacción positiva cuando ocurre el viraje a amarillo del color azul del medio.

### 9.3.5.3 Producción de Sustancias Reductoras a partir de Sacarosa (SRS)

Esta metodología se utiliza para diferenciar distintas subespecies o patovares de bacterias fitopatógenas.

#### Operatoria

- Pesar 10gr de bactopectona; 5g de extracto de carne; 40g de sacarosa y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 700ml de agua destilada.
- Agitar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada, homogeneizar.
- Ajustar el pH a 7.
- Distribuir de a 5ml en tubos de ensayo y autoclavar a 121°C por 15min.
- Inocular con suspensión bacteriana proveniente de un cultivo puro bacteriano de 24-48hrs.
- Incubar en estufa a 27°C durante 48hrs.
- Añadir a cada tubo 1ml de reactivo de Benedict.
- Agitar y dejar en agua hirviendo 10 a 15min.
- La reacción es positiva cuando se produce un color anaranjado, lo que indica la presencia de compuestos reductores. Si el medio tiene color verdoso, la reacción es negativa o dudosa.

### 9.3.5.4 Producción de Lévano a partir de Sacarosa

Esta metodología se utiliza para diferenciar los distintos patovares de la especie *Pseudomonas syringae*.

#### Operatoria

- Pesar 2g de extracto de levadura; 5g de bactopectona; 5g de NaCl; 50g de sacarosa; 20g de agar y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 700ml de agua destilada.
- Agitar y llevar a 80°C hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada, homogeneizar y ajustar el pH a 7-7,2.
- Autoclavar a 121°C por 15min.
- Preparar placas Petri estériles marcándolas con la palabra "Levano" en la tapa inferior de la placa.
- Cuando el medio esté a una temperatura de 45-50°C distribuir de a 25ml en cada placa en el interior del gabinete de bioseguridad.
- Dejar solidificar y almacenar las placas invertidas a 4°C.
- Sembrar por estrías un cultivo puro bacteriano de 24-48hrs con asa de siembra.
- Incubar 48 horas a 27°C sin invertir las placas.
- La reacción es positiva si se produce crecimiento abombado muy mucoso.



### 9.3.5.5 Utilización de Compuestos Nitrogenados

#### a) Degradación de la Arginina (Thornley)

La capacidad que tienen algunas bacterias para crecer en condiciones de anaerobiosis cuando disponen de arginina constituye un carácter diferencial en la clasificación de las bacterias del género *Pseudomonas* y en la diferenciación de biovares en la especie *Erwinia chrysanthemi*.

#### Operatoria

- Pesar 1g de bactopectona; 5g de NaCl; 0,3g de  $K_2HPO_4$ ; 6g de agar; 10g de arginina monoclorhidrate y colocarlos en matraz aforado de 1L.
- Agregar 0,5ml de rojo fenol (solución 1%) y 700ml de agua destilada.
- Agitar y entibiar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Ajustar el pH a 6.
- Repartir en tubos de 5ml.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Antes de utilizar el medio este debe fundirse a fin de sacar el aire.
- Dejar enfriar hasta que se solidifique.
- Sembrar por picadura con una asada de un cultivo bacteriano puro de 24-48hrs.
- Cubrir los tubos con 5ml de vaselina estéril.
- Incubar en estufa a 27°C por 3-15días.
- La reacción es positiva si se produce viraje del indicador de pH de amarillo a rosa o rojo.

#### b) Producción de Indol

Esta metodología permite diferenciar algunas especies de las bacterias del género *Erwinia*.

#### Operatoria

- Pesar 10g de triptona; 1g de L-triptófano y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 700ml de agua destilada.
- Agitar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Repartir en tubos de 5ml.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Sembrar por picadura con una asada de un cultivo bacteriano puro de 24-48hrs.
- Incubar en estufa a 27°C por 2-5días.
- Al finalizar el tiempo de incubación agregar suavemente 0,5ml de reactivo de Kovacs.
- La existencia de metil-indol se traduce por la aparición en 1 minuto de un color rojo cereza en la capa del reactivo.

#### c) Producción de Ureasa

Algunas bacterias degradadoras de urea, como *Erwinia* spp. o *Xanthomonas* spp., producen ureasa, lo cual se manifiesta por la alcalinización del medio al hidrolizarse la urea.

#### Operatoria

- Pesar 1g de peptona neutra; 1g de D(+)glucosa; 5g de NaCl; 2g de  $KH_2PO_4$ ; 12g de agar Oxoid N°3. Colocar en matraz aforado de 1L.
- Agregar 1ml de rojo fenol (solución acuosa 1,2%) y 700ml de agua destilada.
- Agitar y entibiar hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Ajustar el pH a 6,8.

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- Distribuir en volúmenes de 90ml en frascos de 250ml.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Preparar una solución acuosa de urea al 40% y esterilizarla por filtración bajo gabinete de bioseguridad.
- Añadir al medio enfriado (40-55°C) 5ml de la solución de urea.
- Repartir en tubos de a 5ml y dejar solidificar.
- Sembrar por picadura con una asada de un cultivo puro de 24-48hrs.
- Incubar en estufa a 27°C por 2-40días.
- La reacción es positiva si se produce cambio en la coloración del medio de amarillo a rojo cereza o magenta, lo que indica actividad de ureasa.

### 9.3.5.6 Degradación de Macromoléculas

#### a) Hidrólisis del Almidón

La producción de amilasas origina la hidrólisis del almidón, reacción característica de las bacterias de la especie *Xanthomonas campestris*.

#### Operatoria

- Pesar 5g de extracto de levadura; 10g de caldo nutritivo; 20g de agar y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 700ml de agua destilada.
- Agitar y llevar a 80°C hasta disolver completamente.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Autoclavar a 121°C por 15min.
- Preparar placas Petri estériles marcándolas con la palabra "Almidón" en la tapa inferior de la placa.
- Cuando el medio esté a una temperatura de 45-50°C distribuir de a 25ml en cada placa en el interior del gabinete de bioseguridad.
- Dejar solidificar y almacenar las placas invertidas a 4°C.
- Sembrar por puntos o estrías un cultivo puro bacteriano de 24-48hrs con asa de siembra.
- Incubar 48 horas a 27°C o hasta que haya habido un buen crecimiento.
- Aplicar lugol a las placas.
- La aparición de zonas claras debajo o alrededor del crecimiento bacteriano, en contraste con las zonas oscuras del resto del medio, indican hidrólisis.
- Cuando se aprecia solo una zona rojiza quiere decir que el almidón ha sido hidrolizado parcialmente, considerándose el resultado negativo.

#### b) Hidrólisis de la Esculina

La producción de  $\beta$ -glucosidasas hidroliza los compuestos que reaccionan con el  $Fe^{3+}$  dando complejos negruzcos, reacción característica de las bacterias de la especie *Xanthomonas campestris*.

#### Operatoria

- Pesar 10g de bactopectona Difco; 1g de esculina; 0,7g de citrato férrico amoniacal; 20g de agar y colocarlos en un matraz aforado de 1000ml.
- Agregar 700ml de agua destilada.
- Agitar y llevar a 80°C hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Ajustar el pH a 7,2.
- Autoclavar a 121°C por 15min.

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- Preparar placas Petri estériles marcándolas con la palabra "Esculina" en la tapa inferior de la placa.
- Cuando el medio esté a una temperatura de 45-50°C distribuir de a 25ml en cada placa en el interior del gabinete de bioseguridad.
- Dejar solidificar y almacenar las placas invertidas a 4°C.
- Sembrar por puntos o estrías un cultivo puro bacteriano de 24-48hrs con asa de siembra.
- Incubar 48 horas a 27°C o hasta que haya habido un buen crecimiento.
- La hidrólisis de la esculina se manifiesta por el desarrollo de color marrón en el medio al mismo tiempo que se produce la desaparición de la fluorescencia, observable usando una lámpara de luz ultravioleta.

### c) Hidrólisis de Gelatina

La producción de proteasas descompone la gelatina, originando una pérdida de sus propiedades gelificantes. Esta metodología se utiliza principalmente para diferenciar patovares de *Pseudomonas syringae*.

#### Operatoria

- Pesar 120g de bacto gelatina Difco y llevar a matraz aforado de 1L.
- Agregar 700ml de agua destilada.
- Agitar y llevar a 80°C hasta que la solución esté completamente disuelta.
- Aforar con agua destilada y homogeneizar.
- Repartir en tubos de 5ml.
- Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
- Dejar enfriar hasta que se solidifique.
- Sembrar por picadura con una asada de un cultivo bacteriano puro de 24-48hrs.
- Incubar en estufa a 27°C por 3-7 días.
- La reacción es positiva si se mantiene la licuación de la gelatina aunque se coloquen los tubos a 4 ó 5°C durante 30 minutos.
- Al no contar con el reactivo bacto gelatina se prepara la suspensión con 3g de extracto de levadura, 5g de peptona y 120g de gelatina.

### 9.3.5.7 Otras Pruebas

#### a) Oxidasa

Se utiliza para poner de manifiesto la existencia de citocromo C, enzima que interviene en las reacciones de oxidación. Este test tiene carácter diferencial de la clasificación del género *Pseudomonas*.

#### Operatoria

- Utilizar guantes para realizar este test.
- Pesar 0,1g de N-N-Dimetil-1,4 fenilendiamoniodichlorid y colocarlo en un frasco gotario de 50ml protegido de la luz.
- Agregar 10ml de agua destilada.
- Disolver evitando todo contacto con la piel.
- Guardar en frasco oscuro a 4°C máximo 1 semana.
- Colocar en una placa Petri un papel filtro.
- Añadir unas gotas de la solución.
- Frotar inmediatamente un asa de platino cargada de cultivo puro de 24-48hrs.
- La reacción es positiva si aparece un color púrpura en 10 segundos.

	<b>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN</b>	<b>Código: D-GF-CGP-PT-042</b> <b>Versión:01</b>
--	---	---

- Si se produce entre 10 y 30seg la reacción es positiva débil.
- Si el color permanece inalterado después de 30seg la reacción es negativa.

#### **b) Tolerancia a las Sales**

La capacidad de crecer las cepas bacterianas en medios conteniendo un determinado porcentaje de sales se utiliza como ayuda en algunos procesos de identificación.

##### **Operatoria**

- Preparar un caldo nutritivo añadiendo la concentración deseada NaCl.
- Una vez disuelta la sal distribuir en tubos de a 5ml.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15min.
- Dejar enfriar.
- Sembrar por picadura con una asada de un cultivo puro de 24-48hrs.
- Incubar en estufa a 27°C por 5-7 días.
- La aparición de turbidez en el medio indica crecimiento.
- Deberá usarse como control una siembra en el medio sin sal.

#### **c) Temperatura Máxima de Crecimiento**

La capacidad de crecer las cepas bacterianas en medios a una temperatura determinada se utiliza como ayuda en algunos procesos de identificación.

##### **Operatoria**

- Preparar un caldo nutritivo y distribuir en tubos de a 5ml.
- Esterilizar en autoclave a 121°C por 15min.
- Dejar enfriar y sembrar por picadura con una asada de un cultivo bacteriano puro de 24-48hrs.
- Incubar en estufa a la temperatura deseada por 5-7 días.
- La aparición de turbidez en el medio indica crecimiento.

#### **d) Sensibilidad a los Antibióticos**

Se utiliza con frecuencia como complemento en la identificación de muchas bacterias.

##### **Operatoria**

- Preparar agar nutritivo en placas Petri.
- Aplicar 100µl de una suspensión bacteriana procedente de un cultivo puro de 24-48hrs.
- Agregar mediante pinzas discos de los antibióticos que se deseen estudiar.
- Incubar en estufa a 27°C por 3-5 días.
- La no aparición de crecimiento bacteriano alrededor del disco es indicativo de la sensibilidad de la cepa al antibiótico correspondiente.

#### **e) Pudrición en papa**

- Tomar un tubérculo de papa y desinfectar con hipoclorito de sodio al 1%.
- Colocar papel absorbente en una bandeja con tapa y humedecer. Luego colocar en la bandeja tapas de placas Petri.
- Cortar el tubérculo en los extremos y luego en la mitad.
- Colocar la mitad del tubérculo en la placa Petri y sacar un trozo de tejido mediante sacabocado y agregar 1ml de suspensión bacteriana.
- Cerrar la bandeja y mantener a temperatura ambiente por 24-48hrs.
- Reacción positiva: se observa pudrición blanda alrededor del orificio dejado por el sacabocado.

#### **f) Hipersensibilidad en tabaco**

- Preparar una suspensión bacteriana concentrada ( $10^8$ - $10^9$ ufc/ml).
- Introducir la suspensión, sin burbujas de aire, en una jeringa de 1ml.
- Inyectar en los espacios intercelulares del envés de las hojas.
- Utilizar de preferencia *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun.
- Al introducir el líquido la superficie de la hoja toma un aspecto húmedo que persiste durante media a 1 hora.
- Dejar a temperatura ambiente por 48-72hrs.
- Reacción positiva: la zona infiltrada se seca y aparecen necrosis ligeramente marrones, que no deben confundirse con las clorosis originadas por los saprófitos.

#### **9.3.6 Interpretación de Resultados**

- Se considerará un **diagnóstico negativo** si en el aislamiento no se obtienen colonias sospechosas.
- Se considerará un **diagnóstico negativo** a la bacteria solicitada si en el aislamiento se obtienen colonias sospechosas y los análisis complementarios resultan negativos.
- Se considerará un **diagnóstico positivo** si en el si en el aislamiento se obtienen colonias sospechosas y los análisis complementarios también resultan positivos.

#### **9.3.7 Formulación Tampones y Medios**

##### **a) AFT**

- |  |       |
|--|-------|
| • NaCl   | 8 g   |
| • $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  | 0,4 g |
| • $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 2,7 g |
| • Agua   | 1 Lt  |

##### **b) Tampón extracción de ADN para PCR Convencional**

- |  |        |
|--|--------|
| • Tris HCL, pH 7,5                       | 24,2g  |
| • NaCl                                   | 14,6 g |
| • EDTA                                   | 9,3 g  |
| • SDS                                    | 5 g    |
| • Polyvinilpyrrolidone PVP-10            | 20 g   |
| • Agua destilada ajustar volumen a 1 Lt. |        |

##### **c) Medio B de King**

- |   |      |
|---|------|
| • Proteasa peptona N°3                      | 20 g |
| • Agar agar                                 | 20g  |
| • $\text{K}_2\text{HPO}_4$                  | 1.5g |
| • $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.5g |
- Agregar 10ml de glicerol y 700ml de agua destilada.
  - Agitar a 80°C para disolver y mezclar los reactivos.
  - Aforar con agua destilada a 1Lt y homogeneizar.
  - Ajustar el pH a 7,2.
  - Trasvasijar a un frasco de mayor volumen y autoclavar a 121°C por 15 minutos.

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE  
BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN MATERIAL DE  
PROPAGACIÓN DE EXPORTACIÓN**

Código: D-GF-CGP-PT-042

Versión:01

**d) MT (Milk Tween medium)**

- Leche descremada 10ml
- CaCl<sub>2</sub> 0.25g
- Proteasa peptona N°3 10g
- Bacto agar 15g
- Tirosina 0.5g
- Tween 80 10ml
- Cefalexina 80mg (en 2ml de NaOH al 4%)
- Cicloheximida 200mg (en 2ml de metanol al 75%)
- Vancomicina 100mg (en 1ml de agua destilada)
- Las soluciones de cefalexina, cicloheximida, vancomicina y leche deben ser esterilizadas por filtración y ser agregadas cuando el medio esté a unos 50°C.

**10. FORMULARIOS**

F-GF-CGP-PT-179	Declaración Jurada para la Designación del Laboratorio Autorizado que prestará Servicios de Análisis Bacteriológico.
F-GF-CGP-PT-113	Formulario de identificación del personal vinculado al/los análisis



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

Código: F-GF-CGP-PT-179  
Versión:01

Por el presente instrumento, yo.....  
..... Cédula de identidad N°.....,  
de nacionalidad....., con domicilio en .....  
....., comuna de  
....., encargado de la empresa .....  
....., declaro bajo juramento:

1- Que todas las muestras vegetales obtenidas en el Establecimiento .....  
..... ubicado en la comuna de ..... deberán ser  
enviadas al siguiente laboratorio autorizado para que realice el diagnóstico de bacterias  
fitopatógenas:

- Nombre o Razón social:.....
- Número y año de su resolución de autorización vigente: .....
- Dirección: .....
- Correo electrónico: .....
- Teléfono: .....

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.

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma Encargado  
Empresa Exportadora

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma Representante  
Legal Laboratorio Autorizado

Fecha Recepción SAG:.....



**FORMULARIO DE IDENTIFICACIÓN DE ANALISTAS  
VINCULADOS AL ANÁLISIS DE LABORATORIOS DE  
ANÁLISIS/ENSAYO**

Código: F-GF-CGP-PT-113  
Versión:01

Identificación del laboratorio:

Nombre/razón social: .....

Cédula de identidad N°/RUT: .....

<b>Nombre Completo</b>	<b>N° cédula de identidad</b>	<b>Firma</b>	<b>Técnica/s que realiza</b>

\_\_\_\_\_  
Firma del postulante o del representante legal

Fecha: .....