

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS,
VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN**

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL
DIAGNÓSTICO DE VIRUS,
VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE
PROPAGACIÓN.**

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

CONTENIDOS

1. OBJETIVOS Y ALCANCE	3
2. REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	4
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS	5
4. REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN DE LABORATORIOS.....	8
4.1 REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA, EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	8
4.1.1 Requisitos de infraestructura	8
4.1.2 Requisitos de equipamiento.....	8
4.1.3 Requisitos de materiales y reactivos	9
4.2 REQUISITOS DE PERSONAL	11
4.2.1 Responsable técnico	11
4.2.2 Analista	12
4.3 REQUISITOS ESPECÍFICOS	12
4.4 MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS.....	12
4.4.1 Dossier legal y antecedentes generales	13
4.4.2 Dossier técnico	13
5. ANÁLISIS/ENSAYOS.....	14
5.1 CONDICIONES PREVIAS	14
5.1.1 Incorporación del laboratorio autorizado a los sistemas de información de muestras	16
5.1.2 Captación de muestras	15
5.2 ENVÍO DE MUESTRAS	15
5.3 RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA/CONTRAMUESTRA	16
5.3.1 Recepción de la muestra	16
5.3.2 Preparación de la muestra de acuerdo al hospedante	18
5.3.3 Manejo de la contramuestra	20
5.4 METODOLOGÍA	20
5.5 CONTROL DE CALIDAD INTERNO	24
5.6 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	28
5.7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS	28
6. REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS.....	29
7. SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS	30
8. OBLIGACIONES.....	31
9. MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO.....	32
10. FORMULARIOS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS	33

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

1. OBJETIVOS Y ALCANCE.

El presente documento establece los requisitos y obligaciones que deben cumplir los interesados que voluntariamente postulen ante el SAG, para actuar como laboratorios de análisis/ensayo para el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas fitopatógenos en tejido vegetal utilizado como material de propagación, en el marco de los siguientes programas técnicos del SAG:

- a) Certificación de Plantas Frutales.
- b) Certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación, con la excepción de semilleros y bulbos ornamentales ya que sus análisis están normados en otros instructivos técnicos.
- c) Fiscalización de viveros para la determinación de plagas no cuarentenarias reglamentadas (PNCR).

Asimismo, este documento entrega las condiciones que deben cumplir estos laboratorios, una vez autorizados.

El alcance de la autorización será de carácter nacional, se **otorgará por hospedante (género o grupo de géneros) para cada programa técnico, abarcando la totalidad del diagnóstico de las plagas y técnicas diagnósticas requeridas según lo indicado en el documento general "Lista de plagas en el marco del instructivo técnico para el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación"**, en adelante "Lista de plagas" (D-ATR-AAT-066).

El laboratorio debe **realizar para cada especie vegetal hospedante, la totalidad de los diagnósticos de virus, viroides y fitoplasmas fitopatógenos indicadas en la lista de plagas**, conforme a las técnicas indicadas según el programa técnico. En aquellos casos que exista más de una técnica de diagnóstico autorizada, el laboratorio autorizado deberá realizar el diagnóstico según la técnica informada por el Servicio o el tercero autorizado, para el caso de muestreadores autorizados de material de propagación para el diagnóstico de plagas no cuarentenarias reglamentadas PNCR, en el "Acta de toma de muestras" enviada al laboratorio autorizado o según lo indicado en el sistema SISVEG, de acuerdo con el programa técnico que envía la muestra.

El Servicio podrá ampliar el número de plagas 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 de Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos.

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, otras metodologías (PCR en tiempo real) o variantes de las indicadas en este instructivo, las que deberán presentar un informe de validación de estas para su evaluación y aprobación por parte del SAG.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

2. REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS.

- Ley 18.755, que fija la organización y atribuciones del Servicio Agrícola y Ganadero y sus modificaciones.
- Ley 19.880, que establece bases de los procedimientos administrativos que rigen los actos de los órganos de la administración del estado.
- Resolución Exenta del Servicio N° 3.571 de 2020, que aprueba Reglamento de General del Sistema de Nacional de Autorización de Terceros, o aquella que la modifique o reemplace.
- Resolución Exenta del Servicio N° 90 de 2014, que aprueba el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos Servicio Agrícola y Ganadero, o aquella que la modifique o reemplace.
- Resolución Exenta del Servicio N° 1.454 de 2019, que establece Requisitos Generales de Certificación de Semillas y Plantas Frutales.
- Resolución Exenta del Servicio N° 6.315 de 2019, que establece Norma Específica de Certificación de Material Vegetal de Propagación de vides (*Vitis spp.*).
- Resolución Exenta del Servicio N° 2.974 de 2018, que establece Norma Específica de Certificación de Material Vegetal de Propagación de Avellano (*Corylus avellana* L.).
- Resolución Exenta del Servicio N° 10.143 de 2015, que establece Norma Específica de Certificación de Material de Propagación de olivo (*Olea europea* L.).
- Resolución Exenta del Servicio N° 10.140 de 2015, que establece Norma Específica de Certificación de material de Propagación de las Especies de los Géneros *Ribes spp.*, *Rubus spp.* y *Vaccinium spp.*
- Resolución Exenta del Servicio N° 6.551 de 2012, que establece Norma específica de certificación de materiales de propagación de carozos y pomáceas.
- Resolución Exenta del Servicio N° 7.520 de 2013, que establece Norma Específica de Certificación de material de Propagación de Cítricos.
- Resolución Exenta del Servicio N° 7.521 de 2013, que establece Norma Específica de Certificación de material de Propagación de Frutillas.
- Faggioli, F. et Al. Distribution of olive tree viruses in Italy as revealed by One Step RT-PCR (2005), 87(1), 49-55.
- Procedimiento "Certificación Fitosanitaria de Productos Agrícolas y Forestales de Exportación", código P-CER-CER-PA-001.
- Resolución Exenta del Servicio N° 2.455 de 2013, que oficializa sistema y requisitos para la certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación.
- Resolución Exenta del Servicio N° 8.911 de 2020, que establece lista de plagas no cuarentenarias reglamentadas para material de propagación de especies de cítricos y las medidas fitosanitarias para su supresión.
- Resolución Exenta del Servicio N° 4.145 de 2021, que establece lista de plagas no cuarentenarias reglamentadas para material de propagación de vid y las medidas fitosanitarias obligatorias para su supresión.
- Resolución Exenta del Servicio N° 3.080 de 2003, que establece criterios de regionalización en relación a las plagas cuarentenarias para el territorio de Chile.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS.

- Laboratorio Autorizado** : Persona natural o jurídica externa, evaluada y aprobada por el Servicio para ejecutar uno o más análisis/ensayos determinados, en el marco de programas oficiales del SAG, de acuerdo a lo estipulado y bajo las condiciones definidas en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento Específico de Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos y los correspondientes Instructivos Técnicos o Protocolos/Plan de trabajo, según corresponda.
- Analista** : Persona designada por el laboratorio autorizado que cumple con el perfil definido por el Servicio y cuenta con el visto bueno del SAG para desempeñar este cargo.
- Responsable Técnico** : Persona designada por el laboratorio autorizado para actuar como contraparte del SAG, siendo el encargado de realizar, coordinar y controlar, según lo que corresponda, aspectos técnicos asociados a la actividad cuya ejecución ha sido autorizada y quien debe cumplir con el perfil definido por el SAG y contar con el visto bueno para desempeñar este cargo. Además, tiene la responsabilidad directa de la correcta ejecución de las actividades que el laboratorio autorizado realiza en el ámbito de su autorización.
- Material de Referencia** : Material, sustancia u organismo que provee trazabilidad esencial y se usa para demostrar la exactitud de los resultados, calibraciones de equipos y métodos, para monitorear el funcionamiento del laboratorio, para validar métodos y que permite la comparación de métodos, usándolos como estándares transferibles.
- BPL** : Las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) representan el conjunto de reglas, procedimientos operativos y prácticas adecuadas para garantizar que los datos generados por los laboratorios sean confiables y que aseguren un nivel de bioseguridad adecuado para el riesgo asociado al desarrollo de los análisis. Identifican, definen y describen los principios que deben regir sobre los procesos de la organización y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la planificación y ejecución de los análisis de laboratorio para asegurar la calidad de los ensayos. Los principios de las BPL son: instalaciones adecuadas, personal calificado, equipo adecuado y calibrado, y procedimientos técnicos estandarizados.

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

- ELISA** : Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, técnica serológica en la cual, un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo de señal.
- DAS-ELISA** : Double Antibody Sándwich ELISA: Modalidad de ELISA que conlleva, la captura del antígeno por un anticuerpo unido a soporte sólido. El antígeno inmovilizado es reconocido y unido por un segundo anticuerpo conjugado con una enzima que permite la detección del antígeno mediante una reacción colorimétrica.
- PCR Convencional** : Polimerase Chain Reaction. Reacción en cadena de la polimerasa, técnica con la cual se obtiene un gran número de copias de un fragmento de ADN específico, mediante ciclos térmicos que son separados electroforéticamente y visualizados en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.
- PCR Nested** : PCR Nested o Anidado variante de la PCR convencional que consiste de dos amplificaciones en serie, con distintos pares de partidores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección.
- Planta madre** : Planta completa o parte de una planta, desde la cual se extrae material de propagación vegetal (yemas, púas, hijuelos, esquejes, semillas, explantes u otras partes) para iniciar o formar una nueva planta de la misma especie y variedad, a través de métodos convencionales de propagación (por enraizamiento de partes o segmentos vegetales e injertos en plantas receptoras) o de micropropagación con tejidos vegetales en cultivos in vitro.
- Plaga no cuarentenaria reglamentada (PNCR)** : Plaga no cuarentenaria cuya presencia en las plantas para plantar afecta el uso previsto para esas plantas con repercusiones económicamente inaceptables y que, por lo tanto, está reglamentada en el territorio nacional. En adelante, entiéndase como PNCR, las plagas reglamentadas indicadas en las Resoluciones Exentas del Servicio N° 8.911 de 2020 y N° 4.145 de 2021.
- RT-PCR** : Variante del PCR en que hebras de ARN por acción de la transcriptasa reversa generan ADN complementario que es usado como templado en una PCR convencional.
- RT-PCR en Tiempo Real** : Variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que consiste en amplificar y simultáneamente detectar la generación del producto de la amplificación.
- Fitopatógeno** : Agente virulento, capaz de infectar una planta.
- Servicio/SAG** : Servicio Agrícola y Ganadero.

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

- Signo** : Presencia del agente causal en una planta enferma.
- Síntoma** : Expresión externa o interna de alteraciones morfológicas por la acción de un agente causal en una planta enferma.
- CSM** : Sistema de Semillas y Plantas Frutales, sistema en línea que se encuentra disponible en la dirección <http://csm.sag.gob.cl>.
- Monitoreo** : Actividad desarrollada por personal capacitado y que tiene la finalidad de identificar sintomatología o la presencia de plagas de interés para el SAG a nivel de huerto productivo.
- Muestreador** : Persona capacitada y calificada y que cuenta con el visto bueno del Servicio para realizar labores de muestreo a nivel de huerto productivo.
- Muestreo** : Revisión de un cultivo, en busca de una determinada plaga o enfermedad, incluyendo la recolección de muestras vegetales o plagas a nivel de huerto productivo, cumpliendo los protocolos técnicos definidos para la actividad.
- Prosector/a** : Persona capacitada y calificada para realizar monitoreo/s a nivel de huerto productivo.
- Protocolo/Plan de Trabajo** : Documento o lineamiento establecido por el SAG en base a los requisitos de la ONPF o u otros organismos oficiales del mercado o país de destino, que describe el procedimiento para las actividades de muestreo, monitoreo y análisis.
- SISVEG** : Sistema de información de sanidad vegetal. Plataforma informática que constituye el repositorio de muestras colectadas en el programa de fiscalización de viveros.
- Trazabilidad de la muestra** : Sistema de documentación que permite la identificación de la muestra desde su recolección y su posterior ingreso al laboratorio hasta la emisión del resultado.
- Vivero** : Lugar o conjunto de instalaciones para multiplicar o reproducir plantas para plantar (a partir de yemas, estacas, esquejes, meristemas, semillas, bulbos, rizomas y otras estructuras geófitas), por métodos tradicionales (siembra, plantación en suelo o sustrato) o micropropagación (siembra o plantación en geles u otros medios de cultivo), para después de criadas ser transplantadas a su lugar definitivo. Sinónimo: Criadero de plantas.
- ONPF** : Organización Nacional de Protección Fitosanitaria.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

4. REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN DE LABORATORIOS.

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, ya sea mediante paneles o piezas separadas, en donde se efectúan actividades incompatibles, para evitar contaminación cruzada.

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

- Para desarrollar la técnica de ELISA; el laboratorio debe contar al menos con tres (3) salas separadas para: preparación de muestras, laboratorio de serología y lavado.
- Para desarrollar la técnica de RT-PCR convencional y PCR anidado; el laboratorio debe contar al menos con cuatro (4) salas separadas: preparación de soluciones, Extracción de ARN y/o ADN, amplificación y electroforesis.

4.1.2 Requisitos de equipamiento.

El laboratorio, debe contar con los equipos necesarios acordes al volumen de muestras y que garanticen el correcto desarrollo de la metodología de análisis. Los equipos deben contar con certificado de mantención y/o calibración vigente, efectuada a lo menos una vez cada 2 años por una empresa pertinente y reconocida en el área.

- a. Equipamiento para la realización de los análisis a través de la **técnica ELISA**, se debe considerar como mínimo el siguiente:
- 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 1 a 500 g con una resolución de 0,1 g.
 - Estufa de incubación que alcance una temperatura de 37 °C, con un error máximo de ± 1 °C.
 - Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl, o equivalente.
 - Peachímetro.
 - Agitador magnético.
 - Freezer que alcance temperaturas de -20 °C o menores.
 - Refrigerador que alcance una temperatura de 6 °C ± 2 °C.
 - Conservadora de muestras que alcance una temperatura de 6 °C ± 2 °C.
 - Lector ELISA con sistema de impresión de registros de los resultados trazables (fecha y hora).

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

b. Equipamiento para la realización de los análisis a través de la técnica RT-PCR convencional y PCR anidado, se debe considerar como mínimo el siguiente:

- 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.
- Cámara para preparar mix de síntesis o de amplificación.
- Cámara para agregar ácido nucleico (ARN, ADNc o ADN) a mix de síntesis o amplificación.
- Balanza rango de uso 0,01 a 500 g. con una resolución de 0,1 g.
- Microcentrífuga (hasta 14.000 r.p.m.)
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 ul, de uso exclusivo para la técnica
- Refrigerador que alcance una temperatura de 6 °C ± 2 °C
- Conservadora de muestras a que alcance una temperatura de 6 °C ± 2 °C
- Freezer que alcance temperaturas de -18 °C o menores
- Mezclador Vortex
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Sistema de fotodocumentación

4.1.3 Requisitos de materiales y reactivos.

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

Deberá contar con todos los kits de diagnósticos 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:

a. Para técnica ELISA: debe contar con Kit de diagnóstico de acuerdo a los hospedantes y virus, según lo indicado en la Tabla Identificación de los kits ELISA por hospedante y Virus (Tabla 4 del documento "Lista de plagas", código D-ATR-AAT-066).

Además de contar con los kits respectivos, se debe contar con los siguientes insumos para el desarrollo de la técnica ELISA:

- Controles positivos y negativos para los virus indicados en la tabla 4 del documento Lista de Plagas código D-ATR-AAT-066.
- Placas ELISA.
- Puntas de micropipetas.
- Bolsas para extracción.
- Microtubos de 1,5 o 2,0 ml.
- Buffer de extracción o reactivos necesarios para su preparación.
- Buffer de lavado o reactivos necesarios para su preparación.
- Buffer conjugado o reactivo para su preparación.
- Buffer sustrato o reactivos para su preparación.
- p-nitrofenilfosfato

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

b. Para técnica RT-PCR: debe contar con reactivo e insumo de acuerdo a los hospedantes indicados en la Tabla I descrita a continuación:

Tabla I. Identificación de reactivos e insumos para técnica de diagnóstico RT-PCR por hospedante.

Frambuesos, Moras y Arándanos	Carozos y Pomáceas, Vides, Olivo, Avellano y Cítricos
Bolsa de extracción	Bolsa de extracción
Buffer de extracción de Litio	Buffer extracción de sílica
Microtubo de 1,5 ml	Microtubo de 1,5 ml
Agua libre de nucleasas	Sarcosina al 10%
β mercaptoetanol	β -mercaptoetanol
Acetato de potasio 6M	Solución de NaI
Isopropanol	Etanol absoluto
Etanol 70%	Suspensión de Sílica
Agua libre de nucleasas	Buffer de lavado
Random Primer	Agua libre de nucleasas
Buffer 5x	Random Primer
dNTPs 10 mM	Buffer 5x
DTT 0.1 mM	dNTPs 10 mM
MMLuV 200 U/ul	DTT 0.1 mM
Buffer Taq Polymerasa10X	MMLuV 200 U/ul
Taq Polymerase 5 U u/l	Buffer Taq Polymerasa10X
MgCl ₂ 50 mM	Taq Polymerase 5 U u/l
Partidores	MgCl ₂ 50 mM
Agarosa para electroforesis	Partidores
Solución TAE 1X	Agarosa para electroforesis
Marcador de tamaño 100 bp	Solución TAE 1X
	Marcador de tamaño 100 bp

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

- c. **Para técnica PCR anidado:** debe contar con reactivo e insumo de acuerdo a los hospedantes indicados en la tabla II.

Tabla II. Identificación de reactivos e insumos para técnica de diagnóstico PCR Anidado para análisis de Fitoplasma.

Hospedante Vides, Manzano y Mora
Bolsa de extracción
Buffer de extracción de CTAB
β mercaptoetanol
Microtubo de 2,0 ml
Cloroformo
Isopropanol
Etanol 70%
Agua libre de nucleasas
Buffer Taq Polymerasa10X
Taq Polymerase 5 U u/l
MgCl ₂ 50 mM
dNTPs 10 mM
Partidores universales fitoplasma Anexo 2
Agarosa para electroforesis
Solución TAE 1X
Marcador de tamaño 1 Kb

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 de la correcta ejecución de las actividades que el laboratorio autorizado realice en el ámbito de su autorización. Asimismo, deberá cumplir con el siguiente perfil:

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

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

4.2.2 Analista

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 comprobable (de al menos 6 meses) en diagnósticos de virología, técnicas serológicas y/o técnicas moleculares dependiendo de las técnicas a la que se postulen.

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

4.3 Requisitos específicos.

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

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

4.4 Medios de verificación de requisitos.

El laboratorio postulante interesado en autorizarse para realizar el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación, debe presentar **junto a la solicitud de autorización** código F-GF-CGP-PT-068, **o ampliación** código F-GF-CGP-PT-075, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

4.4.1 Dossier legal y antecedentes generales.

Los documentos y antecedentes generales que se deben presentar se especifican a continuación, en base a lo establecido en el Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, numeral 6.1, letra A:

- i. Fotocopia por ambos lados de la cédula de identidad del postulante.
- ii. Fotocopia del rol único tributario de la persona jurídica postulante.
- iii. Cédula de identidad por ambos lados del respectivo representante legal o documento de identificación oficial para el caso de extranjeros.
- iv. Declaración jurada simple, según formato establecido en el formulario código F-ATR-AAT-312, aplicable tanto para personas naturales como personas jurídicas.
- v. Copia del documento tributario correspondiente al pago realizado por concepto de postulación a la autorización ante el SAG, de acuerdo al sistema tarifario vigente.
- vi. Autorización de publicación de datos de terceros autorizados ante el SAG, para fines institucionales, firmada por el postulante o su representante legal en el caso de tratarse de persona jurídica, según formato establecido en el formulario código F-ATR-AAT-314.
- vii. Documento que acredite la personería del representante legal para actuar en nombre del postulante, y certificado de vigencia del mandato con una antigüedad no superior a 30 días corridos.

Adicionalmente, y de conformidad con la Ley N° 19.913, que crea la Unidad de Análisis Financiero y modifica diversas disposiciones en materia de lavado y blanqueo de activos, el laboratorio postulante debe presentar la "Declaración de vínculo con personas expuestas políticamente (PEP)", conforme al formato establecido por la Unidad de Análisis Financiero (UAF) del Ministerio de Hacienda, que se encuentra disponible en su sitio web, <https://www.uaf.cl/legislacion/politica.aspx>.

Cabe hacer presente que los antecedentes legales y antecedentes generales especificados en los numerales iii, iv, vi y vii precedentes, se deben presentar solo en el caso de que sea la primera autorización para laboratorio de análisis/ensayo o si se han generado cambios. Si el laboratorio ya se encuentra autorizado en otro alcance bajo el Reglamento Específico nombrado anteriormente, corresponde tramitar la solicitud como una ampliación de conformidad con lo dispuesto en el numeral 13 del dicho Reglamento Específico.

4.4.2 Dossier técnico.

- a) "Formulario Anexo diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación", código F-ATR-AAT-160, indicando tanto hospedante como el programa técnico al que postula.
- b) Documentación indicada en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, numeral 6.1, letra B:
 - i. Formulario de identificación de responsable técnico propuesto (titular y subrogante si aplica), de acuerdo al formulario código F-GF-CGP-PT-069 o aquél que lo modifique o reemplace.

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS,
VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN**

- ii. Certificado de título del responsable técnico (titular y subrogante si aplica), en original o fotocopia legalizada ante notario.
- c) Documentos que demuestren la experiencia laboral del responsable técnico de al menos 2 años en el en el área de laboratorios, y la competencia técnica o experiencia laboral (de al menos 6 meses) en diagnósticos de virología y técnicas serológicas y/o técnicas moleculares, según corresponda, según lo descrito en el numeral 4.2.1 del presente Instructivo técnico.
- d) Formulario de identificación de analistas vinculados al análisis de laboratorios de análisis/ensayo, según formato código F-ATR-AAT-113.
- e) Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificados/as en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
- f) Documentos que demuestren la competencia técnica o experiencia laboral de los/las analistas en diagnósticos de virología y técnicas serológicas y/o técnicas moleculares, según corresponda.
- g) Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos.
- h) Lista de equipos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio y capacidad cuando corresponda.
- i) Registros de la calibración de los equipos, según corresponda.
- j) Lista de materiales, reactivos y material de referencia.
- k) Manual de procedimientos de acuerdo a lo señalado en el numeral 4.3 de este Instructivo técnico.
- l) Procedimientos que consideren la metodología indicada en el numeral 5.4 de este Instructivo técnico.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el Reglamento Específico de autorización de laboratorios de análisis/ensayos, como en este Instructivo técnico, 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/ENSAYOS.

5.1 Condiciones previas.

5.1.1 Incorporación del laboratorio autorizado a los sistemas de información de muestras.

El SAG debe incorporar al laboratorio autorizado a sistema computacional asociado al alcance. Esto implica dar perfiles de usuario de los Sistemas de Información en los cuales se almacena la información relacionada con las muestras, proporcionando los nombres de usuarios y las contraseñas correspondientes para la correcta gestión del ingreso de muestras, recepción, ingreso de resultados y autorización de resultados.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

En adelante, se describirán acciones generales y específicas a desarrollar por los laboratorios autorizados para el diagnóstico de fitopatógenos de material de propagación, en función de la gestión técnica de los tres programas que requieren información sobre resultados de muestras/análisis.

En tal contexto, es importante mencionar que los laboratorios deberán operar con los programas informáticos indicados en la tabla III o los que el Servicio determine, para la gestión de muestras y resultados.

Tabla III. Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación:

Programa técnico del SAG	Sistema informático de gestión muestras y resultados
Certificación de plantas	Sistema de Certificación de Plantas Frutales (http://csm.sag.gob.cl)
Certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación.	SISVEG (http://sisveg.sag.gob.cl:8080/SISVEG/jsp/Sag_Inicio.htm)
Fiscalización de viveros para el control de plagas no cuarentenarias reglamentadas (PNCR).	SISVEG (http://sisveg.sag.gob.cl:8080/SISVEG/jsp/Sag_Inicio.htm)

5.1.2 Captación de muestras.

El muestreo será realizado por personal del SAG o por terceros autorizados por el Servicio, de acuerdo con los procedimientos establecidos, por lo tanto, no es una actividad de responsabilidad de los laboratorios autorizados en esta especialidad, excepto si éste tiene una autorización vigente en el ámbito de muestreo.

5.2 Envío de muestras.

El despacho de las muestras, será de responsabilidad del funcionario/a de la oficina SAG sectorial a cargo del muestreo o del equipo de muestreo de terceros autorizados por el Servicio, garantizando el envío en el tiempo y en las condiciones de temperatura adecuados (mantención de cadena de frío de ser necesario), según los requerimientos específicos establecidos en el presente Instructivo y/o en los respectivos protocolos de muestreo, según corresponda.

Las muestras deberán ser enviadas al laboratorio autorizado que el viverista, productor o empresa exportadora de material de propagación estime conveniente.

Los costos asociados al despacho y transporte de las muestras serán de cargo de los laboratorios autorizados, por lo que cada laboratorio autorizado deberá designar una empresa de transporte de encomiendas o Courier para el traslado de las muestras tomadas por el SAG o por el tercero, según corresponda. Tales convenios deberán ser informados a el Departamento de Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros, al correo electrónico autorizacion@sag.gob.cl o aquél que lo reemplace, mediante el formulario "Identificación empresa/s de transporte de encomiendas o Courier en convenio", código F-ATR-AAT-085, para su publicación en la Intranet del Servicio. El laboratorio autorizado debe responsabilizarse por contratar servicios que provean agilidad y responsabilidad en el traslado, mantención y

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

entrega de las muestras.

Sobre el manejo de envases y cajas de transporte de muestras: Cuando las muestras sean enviadas en cajas conservadoras de temperatura, el laboratorio autorizado deberá gestionar la devolución de las cajas de transporte de muestras a los remitentes.

Identificación y rotulación de las muestras: Las muestras que son despachadas a laboratorios autorizados deben contener una correcta rotulación que las identifique y las relacionen con el vivero o el sitio de producción desde donde proceden. Los códigos de identificación de muestras son asignados por el SAG o el tercero muestreador autorizado, el cual es obtenido en forma manual o desde los sistemas informáticos utilizados, señalados en la tabla III. Así, las muestras procedentes de los programas fiscalización de viveros y de certificación fitosanitaria de exportación, obtienen un código de identificación creado en el Sistema SISVEG conformado por un número de folio por muestra del lote y un correlativo por cada submuestra, cuando corresponda. Las muestras ingresadas al sistema tendrán una ficha de antecedentes o protocolo de toma de muestras, por cada lote muestreado, en el cual consta la información del lugar muestreado, el propietario de las muestras y las plagas a determinar.

Las muestras ingresadas al SISVEG será identificadas con un código de barras el cual provee información sobre el año, el folio del protocolo y el correlativo. Con estos datos el laboratorio podrá acceder al Protocolo de envío de muestras, en el SISVEG (previa asignación de cuenta y clave de usuario), y podrá gestionar la recepción de las muestras en el sistema, e informar resultados.

El/la funcionario/a SAG o el tercero muestreador autorizado por el SAG, al momento de despachar las muestras al laboratorio autorizado, deberá adjuntar un documento conductor en el cual se indicará el detalle de las muestras enviadas, señalando el programa técnico que requiere el servicio de diagnóstico, el lote de plantación o código asignado según los mercados, los folios, los correlativos y el nombre del viverista o la empresa productora de material de propagación.

5.3 Recepción y manejo de la muestra/contramuestra.

5.3.1 Recepción de la muestra.

El laboratorio autorizado, deberá informar por escrito vía correo electrónico, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, el inicio de actividades asociadas al alcance de la autorización correspondiente a la primera recepción de muestras de la temporada. Este aviso, deberá ser realizado el mismo día de recepción de las muestras, señalando lo siguiente:

INFORMO A USTED QUE EL DÍA DE HOY _____(dd/mm/aaaa) EL LABORATORIO AUTORIZADO _____(indicar nombre) HA DADO INICIO A LAS ACTIVIDADES ASOCIADAS AL ALCANCE DE LA AUTORIZACIÓN, RECEPCIONÁNDOSE _____(indicar cantidad) MUESTRAS VEGETALES PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS y VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE _____ (indicar tipo de material vegetal y especie).

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

a.- Recepción física de muestras:

Toda muestra debe ingresar al laboratorio autorizado con su correspondiente identificación (código de barras, número de solicitud o correlativo numérico) y acompañada por los documentos conductores de las muestras (Acta de Toma de Muestras, Protocolo de envío de muestras u otro, según corresponda), donde se indica la técnica diagnóstica que el laboratorio autorizado debe ejecutar.

El laboratorio autorizado, deberá verificar al momento del ingreso de la muestra, que ésta se encuentre en condiciones adecuadas de embalaje y que el tiempo entre el muestreo y la recepción en el laboratorio sea menor o igual a 72 horas. 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.

Las muestras, se deberán conservar, hasta el momento del análisis, a una temperatura de $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, teniendo la precaución de no compactarlas para no producir deterioro del tejido vegetal.

Si la muestra presenta condiciones de embalaje inadecuadas o no es apta para el análisis, ésta debe ser rechazada por el laboratorio autorizado.

Los rechazos, avisos de incumplimientos u otros problemas observados respecto de la recepción de muestras deberán informarse al SAG dentro de un plazo máximo de 1 día corrido, contado desde la recepción de la muestra por parte del laboratorio autorizado, a los siguientes correos, según el programa técnico de que se trate:

- a) **Certificación de Plantas Frutales:** al correo cpf@sag.gob.cl y al correo del Encargado Regional de Protección Agrícola-forestal y Semillas correspondiente al origen de la muestra.
- b) **Certificación fitosanitaria de material de propagación para exportación:** al correo exportaciones.mapro@sag.gob.cl
- c) **Fiscalización de viveros para la determinación de PNCR:** al correo electrónico viveros.central@sag.gob.cl y al correo del funcionario/a de la oficina Sectorial del SAG de donde procede la muestra.

En esta comunicación por correo electrónico se deberá indicar el problema, identificando el número de folio del Protocolo, el o los números correlativos de las muestras, y solicitar las medidas a seguir (corrección del problema o envío de nueva muestra, según corresponda).

b.- Recepción de muestras en los sistemas:

El laboratorio debe comprobar que la información contenida en el sistema de gestión de muestras o 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 físicas recibidas, así como también con la cantidad de muestras recibidas. Una vez verificado lo anterior, el recepcionista del laboratorio dejará constancia de esto en:

- a) Mediante timbre y firma del formulario oficial, indicando además la fecha y hora de recepción, quedándose el laboratorio autorizado con una copia de este formulario y del documento o guía de despacho de la empresa de encomiendas.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

- b) Mediante la recepción electrónica, en el sistema SISVEG, cuando las muestras fueron ingresadas utilizando esta vía y remitidas por los programas Fiscalización de Viveros y Certificación Fitosanitaria de materiales de propagación para exportación.
- c) Mediante la validación de los patógenos a analizar, en el programa de certificación de plantas frutales, ingresando al sistema en línea (<http://csm.sag.gob.cl>) el número de folio del Acta de Toma de Muestras recibidas por el proceso de certificación de plantas.

5.3.2 Preparación de la muestra de acuerdo al hospedante.

Se debe extraer el ARN de la muestra con una de las siguientes metodologías según sea el hospedante:

a. Extracción de ARN por el Método de la Captura con sílica para detección de virus y viroides en cítricos, vid, olivo, carozos y pomáceas (documento "Preparación de soluciones para extracción de ARN o ADN", código D-ATR-AAT-073).

- Rotule cada una de las bolsas plásticas con número de extracción, de tal manera que permita identificar la muestra.
- Rotule los tubos nuevos de 1,5 ml, de tal manera que permita la trazabilidad de la muestra.
- Pesar 0,1 gramo de tejido (hoja/ floema), introducir en bolsa de extracción, agregar 1 ml. de buffer de extracción y macerar.
- Transferir 0,5 ml. del macerado a un microtubo de 1,5 ml y adicionar 0,1 ml. de sarcosina al 10% y 1,5 µl β - mercaptoetanol.
- Incubar 10 minutos a 70° C con agitaciones cada 2 minutos.
- Traspasar a hielo por 2 minutos y luego centrifugar a 12.000 rpm. por 5 minutos.
- Transferir 0,3 ml. del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y agregar 300 µl de solución de NaI, 150 µl de etanol absoluto y 25 µl de suspensión de partículas de sílica. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos con agitaciones cada 2 minutos.
- Centrifugar a 6000 rpm. durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante.
- Agregar 0,5 ml. de buffer de lavado y agitar en vortex hasta resuspender el pellet.
- Repetir el paso N° 6.
- Eliminar el sobrenadante con cuidado y secar el pellet a temperatura ambiente invirtiendo el tubo.
- Resuspender el pellet en 0,1 ml. de agua libre de nucleasas e incubarlo durante 2 minutos a 70°C.
- Centrifugar a velocidad máxima durante 3 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, teniendo cuidado de no arrastrar sílica.
- El RNA extraído se almacena a -80° C, hasta su uso.

b.- Extracción de ARN por el Método de extracción con Litio para detección de virus en *Fragaria spp.*, *Vaccinium spp.*, *Rubus spp.* y *Ribes spp.* Hughes D.W., Galau G. 1988 (documento "Preparación de soluciones para extracción de ARN o ADN", código D-ATR-AAT-073).

- Rotule cada una de las bolsas plásticas con número de extracción, de tal manera que permita identificar la muestra.
- Rotule los tubos nuevos de 1,5 ml, de tal manera que permita la trazabilidad de la muestra.

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

- Pese 0,1 gr. de tejido e introduzca la muestra en la bolsa.
- Agregue 1 ml de buffer de extracción de litio con β -mercaptoetanol a una concentración final del 0,1 %.
- Macere la muestra con ayuda del equipo molidor "Homex".
- Transfiera 600 μ l del macerado al tubo previamente rotulado y adicione 600 μ l de acetato de potasio 6M.
- Agite el tubo por inversión al menos 10 veces.
- Centrifugue a 13.000 rpm durante 10 minutos.
- Rotule tubos nuevos de 1,5 ml, de tal manera que permita la trazabilidad de la muestra.
- Transfiera 750 μ l del sobrenadante al nuevo tubo y agregue 750 μ l de Isopropanol.
- Agite el tubo por inversión al menos 10 veces.
- Centrifugue a 14.000 rpm durante 20 minutos.
- Elimine el sobrenadante con cuidado y lavar el pellet con 1 ml de etanol 70% frio.
- Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante con cuidado y deje secar el pellet durante al menos 1 hora a temperatura ambiente.
- Resuspenda el pellet en 40 μ l de agua libre de nucleasas.
- Los ácidos nucleicos extraídos son almacenados a -20° C, hasta su uso.

c.- Extracción de ADN por método CTAB para detección de fitoplasmas en vides, moras y pomáceas (documento "Preparación de soluciones para extracción de ARN o ADN", código D-ATR-AAT-073).

- Rotule cada una de las bolsas plásticas con número de extracción, de tal manera que permita identificar la muestra.
- Rotule los tubos nuevos de 2,0 ml, de tal manera que permita la trazabilidad de la muestra.
- Pesar 0,5 gramo de tejido (nervadura central), introducir en bolsa de extracción, agregar 3,5 ml. de buffer de extracción CTAB, agregue 1,5 μ l β - mercaptoetanol. y macerar.
- Transferir 1,0 ml. del macerado al microtubo de 2,0 ml
- Incubar por 20 minutos a 65° C con agitaciones cada 2 minutos.
- Dejar enfriar por 2 minutos, agregar 1,0 ml de cloroformo y mezclar.
- Luego centrifugar a 11.000 rpm. por 10 minutos.
- Transferir 750 μ L. de la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1,5 ml y agregar 750 μ l de isopropanol, mezclar bien.
- Incubar a -20° c por 30 minutos.
- Centrifugar a 11.000 rpm. durante 15 minuto y eliminar el sobrenadante suavemente para no perder el pellet.
- Agregar 1,0 ml. de de etanol al 70% frio y agitar suavemente el pellet.
- Repetir el paso N° 10.
- Eliminar el sobrenadante con cuidado y secar el pellet a temperatura ambiente invirtiendo el tubo.
- Resuspender el pellet en 100 μ L de agua libre de nucleasas.
- El ADN extraído se almacena a -80° C, hasta su uso.

En la siguiente Tabla IV, se indica la preparación de la muestra de acuerdo a la especie vegetal a considerada.

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

Tabla IV. Preparación de la muestra de acuerdo al hospedero.

Frambuesos, Moras, Arándanos y Frutillas	<p>Para las muestras que requieran la detección de los virus por ELISA, se tomarán 0,5 g de tejido foliar y se extraerán de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de anticuerpos utilizado.</p> <p>En caso de que se requiera la detección de virus por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido de hojas que se extraerán por el método de Litio (numeral 5.3.2, letra b).</p> <p>Para las muestras que requieran la detección de Fitoplasmas, se tomarán 0,5 g de nervaduras centrales y se extraerá ADN de acuerdo al método CTAB (numeral 5.3.2 a, letra c).</p>
Carozos, Pomáceas, Vides, Avellanos, Nogal y Palto	<p>Para las muestras que requieran la detección de los virus por ELISA, se tomarán 0,5 g de tejido foliar y se extraerán de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de anticuerpos utilizado.</p> <p>En caso de que se requiera la detección de virus o viroide por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido de hojas o yemas que se extraerán por el método de la sílica (numeral 5.3.2 a, letra a).</p> <p>Para las muestras que requieran la detección de Fitoplasmas, se tomarán 0,5 g de nervaduras centrales y se extraerá ADN de acuerdo al método CTAB (numeral 5.3.2 a, letra c).</p>
Olivos	<p>Para las muestras que requieran la detección de los virus CLRV y SLRSV por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido floemático de ramillas que se extraerán por el método de la sílica (numeral 5.3.2, letra a).</p>
Cítricos	<p>Para las muestras que requieran la detección de CTV por ELISA, se tomarán 0,5 g de tejido foliar y se extraerán de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit de anticuerpos utilizado.</p> <p>En caso de que se requiera la detección de virus o viroides por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido foliar que se extraerán por el método de la sílica (numeral 5.3.2, letra a).</p>

5.3.3 Manejo de la contramuestra.

Independiente del hospedero, se deberá mantener al menos 2 tubos de 1,5 o 2 ml con tejido de la muestra macerado en tampón de extracción para ELISA y los extractos de ARN, por al menos 6 meses, después del análisis. El mantenimiento se deberá realizar a una temperatura de -20 ± 2 °C. Además, para las muestras positivas, se deberá conservar tejido a -20 °C por al menos tres meses, posteriores a la recepción de la muestra.

5.4 Metodología.

a. Para análisis de ELISA.

La metodología de análisis a utilizar, deberá seguir las especificaciones técnicas (diluciones, tiempos de incubación, etc.) del fabricante de cada tipo de Kit, según lo indicado en la Tabla 4 del documento "lista de plagas", código D-ATR-AAT-066.

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.

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

Se deberán incluir en cada placa, controles positivos (al menos 2 pocillos) y controles negativos (al menos 3 pocillos). Los controles positivos, podrán corresponder a controles proporcionados por la empresa proveedora del kit de diagnóstico o muestras propias que estén infectadas por el o los virus a analizar, y que estén debidamente almacenadas y validadas en su condición. Esta validación, debe ser realizada en forma previa al proceso de muestras oficiales, y puede realizarse realizando un test en los cuales se incluyan controles comerciales y las muestras postulantes a control.

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 proveedor.

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

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

Eventualmente, el Servicio podrá establecer modificaciones a las pautas de análisis, para lo cual el laboratorio, será informado a través de capacitaciones específicas y los acuerdos técnicos serán agregados como documentos adicionales a este Instructivo.

b. Para análisis de RT-PCR.

El diagnóstico de los virus y viroides, por la técnica molecular de RT-PCR en dos pasos, consiste en términos generales en la extracción de ARN total, el cual es utilizado en una retrotranscripción, para sintetizar cDNA que será usado como molde para la amplificación con partidores específicos para los virus y/o viroides a analizar, el detalle del procedimiento para cada hospedero, se describe en el documento "Protocolos de RT-PCR en dos etapas por especie hospedante", código D-ATR-AAT-072.

Se deberán incluir a lo menos un control positivo, un control negativo y un control de coctel. Los controles positivos, corresponderán a muestras de tejido vegetal que estén infectadas por el virus a analizar, que estén debidamente almacenadas y validadas en su condición, los controles negativos, corresponderán a muestras de tejido vegetal que no presentan el virus a analizar, que han sido debidamente almacenadas y validadas en su condición y los controles de coctel, consisten en la amplificación de una mezcla de reacción en que se reemplaza la muestra de templado por agua. Esta validación debe ser realizada en forma previa al proceso de muestras oficiales.

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

c. Detección de fitoplasmas por PCR anidado.

El diagnóstico de los fitoplasmas, se realiza por medio de PCR anidado que permite la detección general de fitoplasmas y consiste en términos generales en la extracción de ADN total, el cual es utilizado como molde para una primera reacción (PCR directa) con los partidores universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Schneider et al., 1995) que amplifican un fragmento de ~1.5 Kb. Posteriormente, para aumentar la sensibilidad de detección, se realiza una segunda

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

amplificación (PCR anidada) con los partidores R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que utilizan como templado el producto de amplificación de la primera reacción de PCR y que amplifican un fragmento de la región 16S rDNA de los fitoplasmas (aprox. 1.200 pb).

Se deberán incluir a lo menos un control positivo, un control negativo y un control de coctel. Los controles positivos, corresponderán a muestras de tejido vegetal que estén infectadas por fitoplasmas, que estén debidamente almacenadas y validadas en su condición, los controles negativos, corresponderán a muestras de tejido vegetal que no presentan fitoplasma, que han sido debidamente almacenadas y validadas en su condición y los controles de coctel, consisten en la amplificación de una mezcla de reacción en que se reemplaza la muestra de templado por agua. Esta validación debe ser realizada en forma previa al proceso de muestras oficiales.

d. Protocolo para Detección de Fitoplasmas.

Dada las especies consideradas dentro del alcance de este Instructivo, se requieren analizar la presencia de los siguientes fitoplasmas:

Hospedante	Fitoplasma y/o Enfermedad asociada
Moras	Rubus stunt Phytoplasm
Pomáceas	Apple rubbery wood phytoplasma (ARW)
	Candidatus Phytoplasma pyri
Vides	Grapevine yellows (Candidatus phytoplasma asteris subgrupo 16SrI-B y 16SrI-C)
	Grapevine yellows (Candidatus phytoplasma fraxini, subgrupo 16RsVII-A)
	Stolbur group (Stolbur subgrupo 16SrXII-A)
	Virginia grapevine yellows phytoplasma
	VK grapevine yellows phytoplasma en vides

Este diagnóstico, se realiza a través de un PCR anidado o nested-PCR que consiste en:

PCR directo

Diluya la muestra de ADN extraída en una proporción 1:20

Se prepara el siguiente Mix de PCR.

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 2.5 mM	2 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer P1 10 µM	1 ul
Primer P7 10 µM	1 ul
Taq	0.25 ul
H ₂ O	14.25 ul
DNA (1/20)	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el DNA y se inicia el programa de PCR que consiste en:

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

Programa PCR

94°C	4 min.	}	39 ciclos.
94°C	1 min.		
55°C	1 min.		
72°C	1,5 min.		
72°C	10 min.		
4° C	∞		

PCR Anidado.

Se diluye el producto del PCR anterior en una proporción 1:20.

Se prepara el siguiente Mix de PCR.

Buffer 10x	2.5 ul
dNTPs 2.5 mM	2 ul
MgCL ₂ 25 mM	1.5 ul
Primer R16 F2n 10 µM	1 ul
Primer R16 R2 10 µM	1 ul
Taq	0.25 ul
H ₂ O	14.25 ul
Primer producto de PCR (1/20)	2.5 ul

Una vez listo el mix de reacción, se alícuota en los microtubos respectivos, posteriormente se agrega el primer producto de PCR y se inicia el programa de PCR indicado anteriormente.

Los partidores utilizados en la PCR de cada PCR se indican en la tabla siguiente:

PCR	Partidor	Secuencia de los partidores (5' -3')	T° de Annealing (T° A)	Referencia / tamaño esperado (bP)
PCR Fitoplasma				
PCR Directo	P1	AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T	55	Deng e Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995
	P7	CGT CCT TCA TCG GCT CTT	55	~1800 bp

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

PCR Nested	R16F2n	ACG ACT GCT AAG ACT GG	55	Lee et al., 1995
	R16R2	TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G	55	~1250 pb

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X.

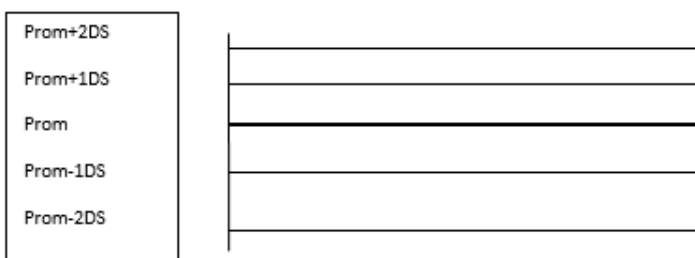
5.5 Control de calidad interno.

a. Para el diagnóstico por ELISA.

Para todos los virus y viroides, 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.

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

- 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 o muestreadores terceros autorizados.
- Cuando 2 puntos del gráfico en forma consecutiva caigan fuera de la zona de Prom+2DS para los controles negativos y/o 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.

b. Para el diagnóstico por RT-PCR.

Los resultados obtenidos serán validados, sólo si, se cumplen las siguientes condiciones, el control positivo deberá presentar una banda del tamaño esperado de acuerdo a lo indicado en la tabla V. Además, tanto la muestra control negativa, como el control de mezcla PCR, no deben presentar banda a la altura esperada para el amplificado.

Tabla V. Control de calidad interno para el tamaño esperado.

Género / Especie	Virus o fitoplasma	Tamaño esperado del Producto de PCR (bp)
Especies de los géneros <i>Ribes</i> spp. <i>Rubus</i> spp. y <i>Vaccinium</i> spp.	ArMV	302
	ToRSV	449
	TRSV	320
	SLRSV	497
	ApMV	417
	RBDV	427
	BRLV (Sinonimia con SNSV)	800
	BSSV	526
	TSV	872
	BIMaV	1.370
	PNRSV	346
	Rubus sutnt Phytoplasma	~1.2kb
Pomáceas	ApMV	417

DOCUMENTO GENERAL

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS,
VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN**

Género / Especie	Virus o fitoplasma	Tamaño esperado del Producto de PCR (bp)
	ASGV	499
	TRSV	320
	ToRSV	449
	ACLSV	632
Carozos	ArMV	302
	ToRSV	449
	TRSV	320
	SLRSV	497
	ACLSV	632
	PPV	243
	PNRSV	346
	PDV	517
	PLMVd	337
	LCV-1	623
	CGRMV	650
	CNRMV	210
	CVA	652
Vides	GLRaV-1	150
	GLRaV-2	589
	GLRaV-3	546
	GFLV	290
	GVA	430
	GVB	469
	ArMV	302
	GRSPaV	512

DOCUMENTO GENERAL

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS,
VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN**

Género / Especie	Virus o fitoplasma	Tamaño esperado del Producto de PCR (bp)
	SLRSV	293
	TRSV	449
	ToRSV	320
Vides	Fitoplasma	~1.2kb
Olivos	CLRV	416
	SLRSV	293
	ArMV	302
Cítricos	CTV	672
	CPsV	600
	CEVd	371
	HSVd, sinonimia CCVd	269
Frutilla	FCILV	300
	SCrV	345
	SLRSV	497
	SMYEV	271
	SVBV	472
	SMoV	384
	ArMV	302
	ToRSV	449
	PNRSV	346
Avellano	PNRSV	346
	PDV	517
	ApMV	417
Nogal	CLRV	416
	PPV	243
Palto	TSV	872

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

5.6 Interpretación de resultados.

a. En el caso del análisis por ELISA.

- Una muestra será considerada positiva cuando: el promedio de los valores obtenidos en los 2 pocillos sea mayor al doble del promedio de los valores obtenidos en los controles negativos (línea de corte), y,
- Una muestra será considerada negativa cuando: sea menor que este parámetro.

Sin embargo, cuando en forma individual 1 pocillo tenga el valor considerado positivo y el otro pocillo 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 del laboratorio, para evaluar las medidas a tomar.

b. En el caso del análisis por RT-PCR

- Una muestra es considerada positiva, si se aprecia una banda del tamaño esperado.
- Una muestra es considerada negativa, si no está presente la banda del tamaño esperado.

La estimación del tamaño de la banda se realiza comparando, su distancia de migración en el gel, respecto al marcador de peso molecular.

c. En el caso del análisis por PCR anidado

- Una muestra es considerada presunta positiva, si se aprecia una banda del tamaño esperado. En tal caso, se deberá enviar la muestra de ADN y contramuestra de tejido a la unidad de Virología Agrícola para su confirmación mediante el análisis RFLP in silico.
- Sera negativa, sino se aprecia la banda del tamaño esperado (~1.2kb) o producto de la confirmación en la Unidad de Virología Agrícola, se indica que no corresponde el fitoplasma analizado.

La estimación del tamaño de la banda se realiza comparando, su distancia de migración en el gel, respecto al marcador de peso molecular.

5.7 Expresión de resultados.

Los resultados para estas técnicas diagnósticas DAS-ELISA, RT-PCR y PCR anidado son cualitativos, esto implica, que una muestra es positiva, si la muestra analizada presenta el patógeno analizado y será negativa, si en la muestra analizada el patógeno no está presente.

Con la finalidad de evitar duplicidad de muestreos y/o análisis, los resultados obtenidos sobre un lote en particular, podrán utilizarse para uno o más de los programas técnicos que están dentro del alcance del presente Instructivo.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

6. REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados deberán publicarse en los sistemas informáticos operativos para cada programa técnico. No obstante, el laboratorio deberá contar con un libro de registro y/o planilla digital de respaldo, formato tipo Excel, sobre los resultados de muestras que incluya el número de folio del acta de toma de muestras con sus correlativos respectivos, fecha de recepción, aceptación/rechazo, resultado, fecha de resultado, firma del analista y observaciones.

Además, el laboratorio deberá mantener un archivador con la orden de análisis, diagrama de carga de la placa de ELISA con lectura adjunta y en el caso de análisis por RT-PCR se debe tener el registro de extracción de ARN asociado a cada muestra y orden de carga de corrida electroforética con foto del gel respectivo. Todos los registros y documentos se deben conservar al menos durante los 5 años siguientes de realizado el análisis.

6.1 Publicación de resultados de muestras analizadas en el proceso de Certificación de Plantas Frutales.

Los resultados correspondientes, se ingresarán e informarán a través del sistema en línea (<http://csm.sag.gob.cl>), en un plazo de quince (15) días hábiles a partir desde la recepción de la(s) muestra(s).

Una vez ingresados los resultados, el laboratorio deberá notificar lo anterior en forma escrita, a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, con copia al correo electrónico cpf@sag.gob.cl, indicando el o los números de folio del acta de toma de muestras (con su correspondiente correlativo) que fueron ingresados al sistema.

6.2 Publicación de resultados de muestras analizadas en el proceso de Certificación fitosanitaria para exportación.

En las muestras provenientes del proceso de certificación fitosanitaria de material de propagación de exportación, los laboratorios autorizados deben registrar el resultado del diagnóstico en el Sistema de Información de Sanidad Vegetal, SISVEG (http://sisveg.sag.gob.cl:8080/SISVEG/jsp/Sag_Inicio.htm) en un plazo máximo de diez (10) días hábiles.

6.3 Publicación de resultados de muestras analizadas en el proceso de Fiscalización de Viveros para la determinación de plagas no cuarentenarias reglamentadas.

Los laboratorios autorizados deben registrar el resultado del diagnóstico sobre la ausencia o presencia de las plagas no cuarentenarias reglamentadas en el Sistema de Información de Sanidad Vegetal, SISVEG (http://sisveg.sag.gob.cl:8080/SISVEG/jsp/Sag_Inicio.htm), en un plazo máximo de quince (15) días hábiles, desde la fecha de recepción de la(s) muestra(s) por parte del laboratorio autorizado.

La autorización de resultados, que permite dejar disponible la información en el sistema SISVEG, debe realizarla el responsable técnico del laboratorio. Los informes fitosanitarios pueden ser impresos o almacenados como archivo digital y deberán ser informados y enviados

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

al **contratante** del servicio, en un plazo no superior a un (1) día hábil después de ingresado el resultado al sistema SISVEG e informar al SAG Sectorial en copia digital.

Los informes fitosanitarios con muestras positivas a plagas cuarentenarias para Chile, indicadas en la Resolución Exenta del Servicio N° 3.080 de 2003, 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 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.

6.4 Retrasos en la entrega de resultados.

Siempre 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, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio con copia al correo electrónico del programa técnico correspondiente (cpf@sag.gob.cl, exportaciones.mapro@sag.gob.cl o viveros.central@sag.gob.cl) y de los encargados técnicos de procesos indicando el número de la muestra en esa situación (folio del acta de toma de muestras con su respectivo número correlativo), para que el Servicio determine los pasos a seguir.

6.5 Confidencialidad de la información.

Cualquier información obtenida, producto del proceso de análisis (resultados parciales o totales u otro) y del manejo de los sistemas informáticos a los cuales el Servicio provea acceso, será de carácter confidencial entre el laboratorio autorizado y el SAG, 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 condición de autorizado.

6.6 Otros reportes.

El Servicio podrá solicitar un informe anual al laboratorio autorizado, el cual podrá ser escrito o a través de una reunión entre las partes.

7. SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS.

De conformidad con lo señalado en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, el convenio de autorización y el presente Instructivo técnico, todo laboratorio autorizado será supervisado por el SAG, a través de al menos una visita de supervisión al año a las dependencias del laboratorio y mediante pruebas de capacidad (pruebas de aptitud u otras) en cualquier momento, para verificar que continúan cumpliendo con las normas de rendimiento, y en general con todas las condiciones que permitieron su autorización.

Una vez realizada la visita de supervisión, se generará un informe, en el que se indicarán los hallazgos encontrados, los que deben ser respondidos por el laboratorio autorizado en los plazos estipulados en dicho informe. Lo anterior es sin perjuicio de la aplicación de una medida por incumplimiento, según sean las obligaciones que se incumplan y las causales establecidas

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

en el Reglamento General, el convenio de autorización, el Reglamento Específico, el presente Instructivo técnico y/o Protocolos correspondientes.

En el caso de detectarse no conformidades u observaciones en que se necesite verificar la implementación de una acción correctiva, se podrá programar visitas de supervisión adicionales, según lo establecido en el Reglamento General, debiendo el laboratorio autorizado pagar la tarifa respectiva por cada una de ellas.

Junto con lo anterior, se realizarán supervisiones en forma indirecta, para lo cual se solicitará el envío de contramuestras para el estudio de concordancia respectivo, con una frecuencia anual, o cuando el Servicio lo estime conveniente. Asimismo, el laboratorio oficial SAG podrá coordinar con los laboratorios autorizados, pruebas de capacidad o rondas interlaboratorios, para evaluar el desempeño de los analistas. En ambos casos, de no obtenerse una buena concordancia en los resultados, se programará una visita de supervisión para verificar la conducción del test.

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

En caso que los supervisores SAG detecten que las no conformidades reiteradas, e incluso los incumplimientos, se deben al actuar del responsable técnico, el Servicio podrá sugerir al tercero autorizado, en el informe de supervisión, que postule a un nuevo responsable técnico.

8. OBLIGACIONES.

El laboratorio autorizado deberá cumplir con lo establecido en el Reglamento General, convenio de autorización, Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos y las siguientes obligaciones específicas del presente Instructivo técnico:

- a) En el caso que, por motivos del transporte propiamente tal, las muestras lleguen al laboratorio en mal estado o que 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 al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, mediante documento escrito enviado vía correo electrónico u otro.
- b) En caso de cambio o término abrupto de convenio con empresa de transporte de encomienda por parte del laboratorio autorizado, éste deberá dar aviso por escrito vía correo electrónico en forma inmediata al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio, con copia al correo autorizacion@sag.gob.cl o aquél que lo reemplace.
- c) No podrá ejercer como laboratorio autorizado para el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación, 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 del producto que se desea certificar, u otras que determine el Servicio.

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

- d) 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 el 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 condición de autorizado.

9. MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO.

El SAG podrá aplicar las medidas por incumplimiento de **suspensión o revocación de la autorización** a los laboratorios autorizados que no cumplan con lo establecido en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, el Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos y las obligaciones específicas del presente Instructivo técnico, de conformidad con lo dispuesto en el título 10 del Reglamento General y punto 10 del Reglamento Específico.

Las medidas señaladas se aplicarán a nivel nacional, sin perjuicio de las sanciones que contemplan las leyes vigentes.

En caso de detectarse algún hallazgo durante las supervisiones, se procederá a evaluar la criticidad de éste, para definir si corresponde que el laboratorio autorizado quede afecto a la aplicación de las medidas por incumplimiento antes señaladas. Para estos efectos, corresponde considerar lo siguiente:

Hallazgos críticos que son causal de suspensión de la autorización:

- a. Fallas en la aplicación de las metodologías de diagnóstico que provocan un resultado falso.
- b. Inconsistencia entre los resultados publicados y los de las contramuestras, en un proceso de verificación por supervisión.
- c. Pérdida o extravío de muestras.
- d. No mantención de contramuestras.
- e. Incumplimiento de la confidencialidad.
- f. No implementación de medidas correctivas frente a la detección de hallazgos previamente observados por SAG.
- g. Incumplimiento en aspectos de personal, equipamiento u otros que afecten directamente la confiabilidad de los resultados.
- h. Reiteración o acumulación de tres o más hallazgos moderados.
- i. Cambios en el personal de laboratorio asociado a la ejecución del análisis objeto de la autorización, sin contar con el visto bueno previo del Servicio.

Hallazgos moderados que son causal de amonestación por escrito:

- a. Incumplimiento de plazos.
- b. No informar cambios de empresa de transporte de muestras e inconvenientes generados por traslado de muestras.

Cabe señalar que, en caso de detectar hallazgos moderados, el supervisor deberá consignar en el informe de supervisión correspondiente, una **amonestación por escrito** y establecer un plazo para solucionar el hallazgo. En caso de que éste no sea subsanado en el plazo establecido, se aplicará la medida por incumplimiento que corresponda.

DOCUMENTO GENERAL

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE VIRUS, VIROIDES Y FITOPLASMAS EN MATERIAL DE PROPAGACIÓN

Las **suspensiones de la autorización durarán el tiempo que determine el Servicio** considerando la gravedad del hallazgo. En el caso de tener que subsanar algún incumplimiento, la suspensión durará, al menos, el tiempo que requiera el laboratorio autorizado para implementar las medidas correctivas y su posterior verificación por parte del Servicio, caso en que la medida de suspensión quedará levantada a contar de la fecha en que el supervisor SAG a cargo de la supervisión comunique por escrito al laboratorio autorizado la verificación conforme de las medidas correctivas por éste implementadas.

Para determinar la aplicación de la **revocación de la autorización** como medida de incumplimiento corresponde considerar las causales descritas en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros y en el Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.

10. FORMULARIOS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS.

Código	Nombre
D-ATR-AAT-066	Lista de plagas en el marco del instructivo técnico para el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación.
D-ATR-AAT-072	Protocolos de RT-PCR en dos etapas por especie hospedante.
D-ATR-AAT-073	Preparación de soluciones para extracción ARN o ADN.
F-GF-CGP-PT-068 o aquel que lo reemplace	Formulario solicitud de autorización de laboratorios de análisis/ensayo.
F-GF-CGP-PT-075 o aquel que lo reemplace	Formulario solicitud de ampliación de la autorización de laboratorios.
F-ATR-AAT-160	Formulario anexo para el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación.
F-GF-CGP-PT-069 o aquel que lo reemplace	Formulario de identificación de responsable técnico.
F-ATR-AAT-113	Formulario de identificación de analistas vinculados al análisis de laboratorios de análisis/ensayo.
F-ATR-AAT-312	Formulario declaración jurada simple para la autorización (personas naturales y jurídicas).
F-ATR-AAT-314	Formulario autorización para la publicación de datos de terceros autorizados por el SAG.
F-ATR-AAT-085	Identificación empresa/s de transporte de encomiendas o Courier en convenio.
F-ATR-AAT-162	Formulario recepción de muestras.
P-CER-CER-PA-001	Certificación Fitosanitaria de Productos Agrícolas y Forestales de Exportación.