

**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**

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

CONTENIDO

1. OBJETIVOS Y ALCANCE.	4
2. REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS.	4
3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS.	6
4. REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN COMO LABORATORIO DE ANÁLISIS/ENSAYO PARA ESTE ALCANCE. ...	9
4.1 <i>Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos.</i>	9
4.1.1 <i>Requisitos de infraestructura.</i>	9
4.1.2 <i>Requisitos de equipamiento.</i>	9
4.2 <i>Requisitos de personal.</i>	11
4.2.1 <i>Responsable técnico.</i>	11
4.2.2 <i>Analista.</i>	11
4.3 <i>Requisitos específicos.</i>	12
4.4 <i>Medios de verificación de requisitos.</i>	12
4.4.1 <i>Dossier legal y antecedentes generales.</i>	12
4.4.2 <i>Dossier técnico.</i>	13
5. ANÁLISIS/ENSAYOS.	14
5.1 <i>Condiciones previas.</i>	14
5.1.1 <i>Incorporación del laboratorio autorizado a los sistemas de información de muestras.</i>	14
5.1.2 <i>Captación de muestras.</i>	15
5.2 <i>Envío de muestras.</i>	15
5.2.1 <i>Sobre el manejo de envases y cajas de transporte de muestras.</i>	15
5.2.2 <i>Identificación y rotulación de las muestras.</i>	16
5.3 <i>Recepción y manejo de la muestra/contramuestra.</i>	16
5.3.1 <i>Recepción de la muestra.</i>	16
5.3.2 <i>Preparación de las Muestras de acuerdo con el hospedante.</i>	18
5.3.3 <i>Manejo de la contramuestra.</i>	18
5.4 <i>Metodología.</i>	18
5.4.1 <i>Para análisis de ELISA.</i>	18
5.4.2 <i>Para Análisis por RT-PCR o PCR Anidado.</i>	19
5.4.3 <i>Para análisis de RT-PCR.</i>	19
5.4.4 <i>Para detección de fitoplasmas por PCR Anidado.</i>	19
5.5 <i>Control de calidad interno.</i>	20
5.5.1 <i>Para el diagnóstico por ELISA.</i>	20
5.5.2 <i>Para el diagnóstico por RT-PCR y PCR Anidado.</i>	21
5.6 <i>Interpretación de resultados.</i>	21
5.6.1 <i>En el caso del análisis por ELISA.</i>	21
5.6.2 <i>En el caso del análisis por RT-PCR.</i>	21
5.6.3 <i>En el caso del análisis por PCR anidado.</i>	21
5.7 <i>Expresión de resultados.</i>	22
6. REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS.	22
6.1 <i>Publicación de resultados de muestras analizadas en el proceso de Certificación de Plantas Frutales.</i>	22

DOCUMENTO GENERAL

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

6.2	<i>Publicación de resultados de muestras analizadas en el proceso de Certificación fitosanitaria para exportación.</i>	23
6.3	<i>Publicación de resultados de muestras analizadas en el proceso de Fiscalización de Viveros para la determinación de plagas no cuarentenarias reglamentadas.</i>	23
6.4	<i>Retrasos en la entrega de resultados.</i>	23
6.5	<i>Confidencialidad de la información.</i>	23
6.6	<i>Otros reportes.</i>	24
7.	SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS.	24
8.	OBLIGACIONES.	25
9.	MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO.	25
10.	DOCUMENTOS Y FORMULARIOS Y RELACIONADOS.	26
10.1	<i>Lista de documentos complementarios.</i>	26
10.2	<i>Lista de formularios relacionados.</i>	27

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

1. OBJETIVOS Y ALCANCE.

El presente Instructivo técnico 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 Instructivo técnico entrega las condiciones que deben cumplir estos laboratorios, una vez autorizados.

El alcance de la autorización será de carácter nacional y 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 denominado "Lista de plagas, en el marco del Instructivo técnico para el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación", código 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 antes mencionada, 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 requerida por el Servicio.

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 dicha autorización 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 formalmente, para la evaluación por parte del Servicio, otras metodologías o variantes de las indicadas en este Instructivo técnico, debiendo acompañar un informe de validación de éstas, para su evaluación y aprobación por parte del SAG.

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.

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

- 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, 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 europaea* 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° 5.429 de 2022, 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° 1.379 de 2024, 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, versión vigente.
- 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, y sus modificaciones, que establece criterios de regionalización en relación con 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.
- 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.

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

- 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 Anidado o PCR Nested** : PCR Nested o Anidado variante de la PCR convencional que consiste en 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.
- Fitopatógenos** : Agente virulento, capaz de infectar una planta.
- Servicio/SAG** : Servicio Agrícola y Ganadero.
- 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.

DOCUMENTO GENERAL

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

- 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** : Proceso aprobado por el SAG para seleccionar y coleccionar unidades representativas para las pruebas de diagnóstico, en la oportunidad, cantidad y calidad que se indique en los protocolos o documentos técnicos definidos para la actividad.
- Prospector/a** : Persona capacitada y calificada para realizar monitoreo/s a nivel de huerto productivo.
- ONPF** : Organización Nacional de Protección Fitosanitaria.
- SISVEG** : Sistema de información de sanidad vegetal. Plataforma informática que constituye el repositorio de muestras coleccionadas 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 trasplantadas a su lugar definitivo. Sinónimo: Criadero de plantas.

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

4. REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN COMO LABORATORIO DE ANÁLISIS/ENSAYO PARA ESTE ALCANCE.

4.1 Requisitos de infraestructura, equipos, materiales y reactivos.

4.1.1 Requisitos de infraestructura.

El postulante a la autorización como laboratorio de análisis/ensayo en este alcance o tercero autorizado, 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.
- Para otras técnicas propuestas por los laboratorios postulantes, los antecedentes de infraestructura serán evaluados por el SAG, en conjunto con la validación presentada.

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.

4.1.2.1 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.

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

- Lector ELISA con sistema de impresión de registros de los resultados trazables (fecha y hora).

4.1.2.2 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 0,01 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.

4.1.2.3 Para otras técnicas propuestas por los laboratorios postulantes, los equipamientos serán evaluados por el SAG, en conjunto con la validación presentada.

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 su autorización.

De acuerdo con la técnica utilizada en los análisis, se indican a continuación los materiales y reactivos que se deben considerar como mínimo:

4.1.3.1 Para técnica ELISA: Se debe contar con Kit de diagnóstico de acuerdo con los hospedantes y virus autorizados, según lo indicado en Tabla 1 del documento general "Kit ELISA, reactivos e insumos requeridos para análisis de RT-PCR y PCR anidado", código D-ATR-AAT-112.

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 Tabla 1 del documento general "Kit ELISA, reactivos e insumos requeridos para análisis de RT-PCR y PCR anidado", código D-ATR-AAT-112.

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

- 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

4.1.3.2 Para técnica RT-PCR: se debe contar con reactivos e insumos de acuerdo con los hospedantes autorizados, indicados en la Tabla 2 del documento general "Kit ELISA, reactivos e insumos requeridos para análisis de RT-PCR y PCR anidado", código D-ATR-AAT-112.

4.1.3.3 Para técnica PCR anidado: debe contar con reactivo e insumo de acuerdo con los hospedantes autorizados, indicados en la Tabla 3 del documento general "Kit ELISA, reactivos e insumos requeridos para análisis de RT-PCR y PCR anidado", código D-ATR-AAT-112.

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. Dicho responsable deberá estar operativo y cumplir con el siguiente perfil:

- Poseer título profesional otorgado por una entidad reconocida por el Estado de Chile, correspondiente a una carrera de las ciencias silvoagrícolas, bioquímicas, biotecnológicas o biológicas. En caso de título obtenido en el extranjero, éste deberá estar revalidado o reconocido, según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación Chileno.
- 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 con 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 o reconocido, según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.

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

- 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 postulante o tercero, previendo una eventual ausencia del responsable técnico o del o los analistas, con motivo de licencias médicas, vacaciones u otras circunstancias, podrá postular a otras personas para que actúen en ausencia del o los titulares, en calidad de subrogantes. En tal caso, el postulante o tercero 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). Debe contar con un manual de procedimientos que describa en detalle el proceso de análisis, en 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 técnico.

El postulante o tercero, una vez autorizado, deberá contar con timbre para ser utilizado en el marco de la autorización que se otorgue en este alcance, que consigne el nombre del laboratorio.

4.4 Medios de verificación de requisitos.

El postulante o tercero 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 solicitud de ampliación código F-GF-CGP-PT-075, según corresponda, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG.

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, en caso de persona natural.
- ii. Fotocopia del rol único tributario de la persona jurídica postulante, si corresponde.
- iii. Cédula de identidad por ambos lados del respectivo representante legal o documento de identificación oficial para el caso de extranjeros.
- iv. Formulario declaración jurada simple para la autorización (personas naturales y jurídicas), código F-ATR-AAT-312, aplicable tanto para personas naturales como personas jurídicas.
- v. Copia del documento que demuestre el pago de la tarifa por postulación a la autorización ante el SAG, etapa I, según el sistema tarifario vigente.

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

- vi. Autorización para la publicación de datos de terceros autorizados por el SAG, 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. Fotocopia de la escritura social de constitución, si el postulante es persona jurídica, con sus respectivas modificaciones si las hubiere, fotocopia de la publicación de extracto respectivo cuando corresponda.
- viii. Certificado de vigencia de la persona jurídica emitido por la autoridad competente. Al momento de la postulación este certificado deberá tener una antigüedad no superior a sesenta (60) días corridos.
- ix. 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 sesenta (60) días corridos, si el postulante es persona jurídica.
- x. Solicitud de notificación a dirección de correo electrónico, según formato establecido en el formulario código F-ATR-AAT-327.
- xi. 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 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 precedentemente se deben presentar solo en el caso de que sea la primera autorización para laboratorio de análisis/ensayo o si se han generado cambios, salvo lo indicado en los numerales iv, v, vi, x y xi, que se debe presentar en cada solicitud. Si el tercero ya está autorizado en otro alcance bajo el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, debe tramitar la solicitud como ampliación, según el numeral 13 del referido 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.
- c) 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.
- d) Certificado de título del responsable técnico (titular y subrogante si aplica), en original o suscrito por medio de firma electrónica en los términos establecidos en la Ley 19.799, sobre documentos electrónicos, firma electrónica y servicios de certificación de dicha firma, en su defecto, fotocopia legalizada ante notario.
- e) 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

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

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.

- f) Formulario de identificación de analistas vinculados al análisis de laboratorios de análisis/ensayo, según formulario código F-ATR-AAT-113.
- g) Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificados/as en el formulario respectivo, en original o suscrito por medio de firma electrónica en los términos establecidos en la Ley 19.799, sobre documentos electrónicos, firma electrónica y servicios de certificación de dicha firma, o en su defecto, fotocopia legalizada ante notario.
- h) 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.
- i) Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos.
- j) Lista de equipos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio y capacidad cuando corresponda.
- k) Registros de la calibración de los equipos, según corresponda.
- l) Lista de materiales, reactivos y material de referencia.
- m) Manual de procedimientos de acuerdo a lo señalado en el numeral 4.3 de este Instructivo técnico.
- n) 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. Asimismo, el SAG podrá solicitar al postulante, la ejecución de la técnica por parte del responsable técnico y/o de uno o más analistas del laboratorio.

En el caso que sea necesario verificar el cumplimiento de los requisitos, el SAG solicitará documentación complementaria.

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 al sistema informático 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 una vez obtengan la autorización para realizar el diagnóstico de fitopatógenos de material de propagación, en función de la gestión técnica de los tres programas oficiales del SAG 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 el documento código D-ATR-AAT-109, denominado "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG".

5.1.2 Captación de muestras.

El muestreo lo realizará personal del SAG o terceros autorizados por el Servicio, según los procedimientos establecidos, por lo que no es responsabilidad de los laboratorios autorizados en este alcance, excepto si tienen 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 cuando el muestreo sea realizado por Inspectores SAG, por lo que cada laboratorio autorizado deberá designar una empresa de transporte de encomiendas o Courier para el traslado de las muestras. Tales convenios deberán ser informados al momento de la autorización en el formulario "Identificación empresa/s de transporte de encomiendas o Courier en convenio", código F-ATR-AAT-085), para posteriores consultas por parte del Servicio. Cualquier cambio relacionado con esto, deberá ser informado al Departamento de Transacciones Comerciales y Autorización de Terceros, al correo electrónico terceros.autorizados@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 fines de gestión interna del Servicio.

En el caso de las muestras de certificación varietal realizadas por Inspectores SAG, será responsabilidad del vivero realizar el envío de los materiales recolectados.

El laboratorio autorizado, debe responsabilizarse por contratar servicios que provean agilidad y responsabilidad en el traslado, mantención y entrega de las muestras.

Cuando el muestro sea realizado por un tercero autorizado, será responsabilidad de estos incluir los costos asociados al traslado de las muestras.

5.2.1 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

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

remitentes, así como la unidad refrigerante (gel pack).

5.2.2 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. 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 informático correspondiente (ver documento general "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109), 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, las plagas a determinar y la técnica a utilizar.

Las muestras ingresadas al sistema informático correspondiente serán identificadas con la información suficiente para individualizar las muestras. Con estos datos el laboratorio podrá acceder al Protocolo de envío de muestras, en el sistema informático correspondiente (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 del SAG 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. La codificación manual sólo será utilizada ante falla de los sistemas descritos en el documento "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109.

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 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 correos definidos por el Servicio según el programa técnico de que se trate (ver documento general "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109).

En esta comunicación por correo electrónico se deberá indicar el problema, identificando la muestra, 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 del sistema de gestión de muestras o del formulario oficial esté completa y que coincida 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.

Las muestras deben venir acompañadas del "Formulario recepción de muestras", código F-ATR-AAT-162.

Para que el Servicio sepa a qué laboratorio deben ser enviadas las muestras, se deberá utilizar la "Declaración jurada para la designación del laboratorio autorizado", código F-ATR-AAT-161, el que deberá ser informado al SAG antes del inicio de toma de muestras.

Una vez verificado lo anterior, el recepcionista del laboratorio dejará constancia de esto mediante:

- a) 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.
- b) Recepción electrónica, en el sistema informático correspondiente, si es que las muestras fueron ingresadas utilizando esta vía y remitidas por los programas

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

Fiscalización de Viveros y Certificación Fitosanitaria de materiales de propagación para exportación.

- c) Validación de los patógenos a analizar, en el programa de certificación de plantas frutales, ingresando al sistema en línea correspondiente (ver documento "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109), el número de folio del Acta de Toma de Muestras recibidas por el proceso de certificación de plantas.

5.3.2 Preparación de las Muestras de acuerdo con el hospedante.

Para la preparación de las muestras a ser analizadas por ELISA, PCR o RT-PCR, se deben seguir las instrucciones indicadas en el documento general, "Preparación de Muestras y Métodos de Extracción de ARN y ADN de acuerdo con el Hospedante" código D-ATR-AAT-113.

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 ± 2 °C. por al menos tres meses, posteriores a la recepción de la muestra.

5.4 Metodología.

5.4.1 Para análisis de ELISA.

La metodología de análisis a utilizar deberá seguir las especificaciones técnicas (diluciones, tiempos de incubación, etc.) del fabricante de los Kits señalados en la Tabla 1 del documento general "Kit ELISA, reactivos e insumos requeridos para análisis de RT-PCR y PCR anidado", código D-ATR-AAT-112.

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

Se deberán incluir en cada placa, controles positivos (al menos 2 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 efectuarse 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.

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

Eventualmente, el Servicio podrá establecer modificaciones a las pautas de análisis, en cuyo caso el laboratorio autorizado será informado a través de capacitaciones específicas y los acuerdos técnicos serán agregados como documentos adicionales a este Instructivo técnico.

5.4.2 Para Análisis por RT-PCR o PCR Anidado.

Para la detección de Virus y Viroides por RT-PCR o Fitoplasmas por PCR como primer paso, se debe extraer el ARN total o ADN respectivamente de la muestra vegetal que, dependiendo del hospedero o tipo de ácido nucleico, se extraerá de acuerdo con métodos indicados en el documento: "Preparación de Muestras y Métodos de Extracción de ARN y ADN de acuerdo con el Hospedante" código D-ATR-AAT-113.

5.4.3 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 los Ítems 1 al 10 del documento general "Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado", 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 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 la que se reemplaza la muestra de templado por agua. Esta validación debe ser realizada en forma previa al proceso de muestras oficiales.

5.4.4 Para 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 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). El detalle del procedimiento para cada hospedero, se describe en el documento general "Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado", código D-ATR-AAT-072, en el ítem 11 denominado "Protocolo para detección de fitoplasmas".

Además, 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 fitoplasmas, 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 realizarse previa al proceso de muestras oficiales.

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

Los laboratorios podrán presentar para la evaluación por parte del Servicio, otras metodologías o variantes de las indicadas en este Instructivo, que una vez aprobadas podrán ser implementadas por laboratorios autorizados. Los antecedentes requeridos serán determinados por el Servicio.

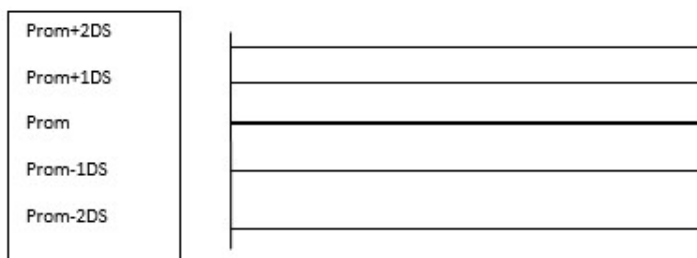
5.5 Control de calidad interno.

5.5.1 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:

- i. Se definirán valores promedios esperados para los materiales de referencia. Estos valores, se pueden obtener a través del análisis de estos materiales, empleando el o los kit/s seleccionado/s 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.
- ii. Con estos valores promedio y las correspondientes desviaciones estándar, se procederá a realizar un gráfico o Carta Control en la cual a través de líneas perpendiculares se definirán distintas áreas.



- Las líneas se definirán como:
 - Línea central: valor promedio.
 - 2 líneas superiores: la primera como el valor promedio más una vez la desviación estándar, y la segunda corresponde al valor promedio más dos veces la desviación estándar.
 - 2 líneas inferiores: la primera como el valor promedio menos una vez la desviación estándar, y la segunda corresponde al valor promedio menos dos veces la desviación estándar.
 - En este cuadro control se graficarán todos los valores obtenidos para cada Kit y sus respectivos materiales de referencia, los cuales se obtienen de los análisis realizados para las muestras analizadas.

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

- 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.

5.5.2 Para el diagnóstico por RT-PCR y PCR Anidado.

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 el ítem 12 del documento "Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado", código D-ATR-AAT-072.

Además, tanto la muestra control negativa, como el control de mezcla PCR, no deben presentar banda a la altura esperada para el amplificado.

5.6 Interpretación de resultados.

5.6.1 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).

Una muestra será considerada negativa cuando: sea menor que este parámetro.

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.

5.6.2 En el caso del análisis por RT-PCR

Una muestra es considerada positiva, si se presenta una banda del tamaño esperado y es considerada negativa, si no está presente la banda del tamaño esperado. En el Ítem 12 del documento general "Protocolos RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado", código D-ATR-AAT-072, se indican los tamaños esperados de los productos de PCR asociados a todos los virus y viroides del alcance.

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

5.6.3 En el caso del análisis por PCR anidado

Una muestra es considerada presunta positiva, si se presenta una banda del tamaño esperado (~1.2kb). En tal caso, se deberá avisar a la sección de Virología agrícola y enviar la muestra de ADN y contramuestra de tejido a la unidad de Virología Agrícola para su confirmación mediante el análisis RFLP *in silico*.

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

Por el contrario, una muestra será considerada negativa, si no se presenta la banda del tamaño esperado (~1.2kb) o si, producto de la confirmación en la Unidad de Virología Agrícola, se descarta que corresponda al fitoplasma de interés.

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 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 técnico.

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 la identificación de la muestra, 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, en el caso de análisis por RT-PCR y PCR anidado, se debe tener el registro de extracción de ARN o ADN 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, según programa técnico, indicado en el documento "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109, en un plazo de quince (15) días hábiles a partir de la recepción de la(s) muestra(s).

Una vez ingresados los resultados, el laboratorio deberá notificar lo anterior a través de correo electrónico, a la Dirección Regional u Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra, indicando el o los números de folio del acta de toma de muestras (con su correspondiente correlativo, si corresponde) que fueron ingresados al sistema.

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

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 en línea, indicado en el documento "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109, 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 en línea, indicado en el documento "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109, en un plazo máximo de quince (15) días hábiles, desde la fecha de recepción de la(s) muestra(s).

La autorización de resultados, que permite dejar disponible la información en el sistema en línea, indicado en el documento "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109, debe realizarla el responsable técnico del laboratorio. Los informes fitosanitarios pueden ser impresos o almacenados como archivo digital.

Los informes fitosanitarios con muestras positivas a plagas cuarentenarias para Chile, indicadas en la Resolución Exenta del Servicio N° 3.080 de 2003 o aquella que la modifique o reemplace, 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, según lo indicado en el punto 6.5 del presente Instructivo técnico.

6.4 Retrasos en la entrega de resultados.

Cuando 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 sistema en línea, indicado en el documento "Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG", código D-ATR-AAT-109, o al Coordinador de Semillas o supervisor de muestreo de la región donde se realizó al toma de muestra, en el caso de Certificación de Plantas Frutales y con copia a 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, si corresponde), 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 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.

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

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, con los hallazgos encontrados, si los hay, 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 en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, el convenio de autorización, el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, 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 realizar visitas de supervisión adicionales, según lo establecido en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, 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 y/o responsable técnico. En ambos casos, de no obtenerse una buena concordancia en los resultados, se programará una visita de supervisión para verificar la conducción del test.

En caso de que los supervisores SAG detecten que las no conformidades y/o incumplimientos reiterados, y que se deban al actuar del responsable técnico o analistas, el Servicio podrá instruir por escrito al tercero autorizado, que postule a una nueva persona para desempeñar el cargo, la cual deberá cumplir con los requisitos establecidos en el Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo y el presente Instructivo técnico. Esta instrucción deberá fundarse en antecedentes objetivos y cuantificables.

Las acciones de supervisión se efectuarán sin perjuicio de las facultades de las facultades fiscalizadoras que amparan el accionar del Servicio.

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

8. OBLIGACIONES.

El laboratorio autorizado deberá cumplir con lo establecido en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, convenio de autorización, Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo 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, a través de documento escrito enviado vía correo electrónico u otro medio.
- 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 terceros.autorizados@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 autorizado, como ser propietario del producto que se desea certificar, u otras que determine el Servicio.
- 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. Si no se respetarse lo anterior, sin 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, convenio de autorización, Reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo y las obligaciones específicas del presente Instructivo técnico.

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 evaluará la criticidad de éste, para definir si corresponde que el laboratorio autorizado quede afecto a la aplicación de las medidas por incumplimiento antes señaladas.

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

Para estos efectos, corresponde considerar lo siguiente:

Hallazgos críticos que constituyen incumplimiento y son causal de suspensión de la autorización:

- Fallas en la aplicación de las metodologías de diagnóstico que provocan un resultado falso.
- Inconsistencia entre los resultados publicados y los de las contramuestras, en un proceso de verificación por supervisión.
- Pérdida o extravío de muestras.
- No mantención de contramuestras.
- Incumplimiento de la confidencialidad entre el laboratorio autorizado y el SAG.
- No implementación de medidas correctivas, en el plazo estipulado, frente a la detección de hallazgos previamente observados por SAG.
- Incumplimiento en aspectos de personal, equipamiento u otros que afecten directamente la confiabilidad de los resultados.
- Reiteración o acumulación de tres o más hallazgos moderados.
- 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.
- Entregar resultado al usuario (empresa) y no al SAG.
- Realizar un análisis no incluido en el alcance.
- Realizar un diagnóstico distinto al solicitado.
- Aplicar una técnica diagnóstica no autorizada o distinta a la indicada por el Servicio.

Hallazgos moderados que constituyen no conformidad:

- No informar cambios de empresa de transporte de muestras e inconvenientes generados por traslado de muestras.
- Retraso de más de un día hábil en la entrega de resultados.
- No informar una muestra no apta.

Cabe señalar que, en caso de detectar hallazgos, sean críticos o moderados, y aun cuando no se encuentren enumerados en los listados precedentes, el supervisor deberá consignarlos en el informe de supervisión correspondiente y establecer un plazo para solucionar el hallazgo, si corresponde. Si éste no se subsana en el plazo establecido, se aplicará una medida por incumplimiento, según el procedimiento establecido en el Reglamento General del Sistema Nacional de Autorización de Terceros, título VI.

10. DOCUMENTOS Y FORMULARIOS Y RELACIONADOS.

10.1 Lista de documentos complementarios.

Código	Nombre del documento complementario
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 RT-PCR en dos etapas por hospedante y PCR anidado.
D-ATR-AAT-073	Preparación de soluciones para extracción de ARN o ADN
D-ATR-AAT-109	Sistemas informáticos operando para gestión de muestras y resultados en material de propagación y contactos SAG.
D-ATR-AAT-112	Kit ELISA, reactivos e insumos requeridos para análisis de RT-PCR y PCR anidado.

DOCUMENTO GENERAL

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

Código	Nombre del documento complementario
D-ATR-AAT-113	Preparación de Muestras y Métodos de Extracción de ARN y ADN de acuerdo con el Hospedante.

10.2 Lista de formularios relacionados.

Código	Nombre del formulario
F-GF-CGP-PT-068 o aquel que lo reemplace	Formulario solicitud de autorización de laboratorios de análisis/ensayo.
F-GF-CGP-PT-069 o aquel que lo reemplace	Formulario de identificación de responsable técnico.
F-GF-CGP-PT-075 o aquel que lo reemplace	Formulario solicitud de ampliación de la autorización de laboratorios.
F-ATR-AAT-085	Identificación empresa/s de transporte de encomiendas o Courier en convenio.
F-ATR-AAT-113	Formulario de identificación del personal vinculado al/los análisis.
F-ATR-AAT-160	Formulario anexo para el diagnóstico de virus, viroides y fitoplasmas en material de propagación.
F-ATR-AAT-161	Declaración jurada para la designación del laboratorio autorizado
F-ATR-AAT-162	Formulario recepción de muestras.
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-327	Solicitud de notificación a dirección de correo electrónico.