



**Instructivo Técnico para el diagnóstico de virus y viroides en tejido vegetal para el Programa de Certificación de Plantas Frutales**

Código: D-GF-CGP-PT-037  
Versión: 01

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA EL DIAGNÓSTICO VIRUIS Y  
VIROIDES EN TEJIDO VEGETAL PARA EL PROGRAMA DE CERTIFICACIÓN  
DE PLANTAS FRUTALES**

## CONTENIDOS

1.	OBJETIVOS Y ALCANCE .....	3
2.	REFERENCIAS Y DOCUMENTOS RELACIONADOS .....	4
3.	DEFINICIONES Y ABREVIATURAS .....	5
4.	REQUISITOS PARA LA AUTORIZACIÓN DE LABORATORIOS.....	7
4.1	REQUISITOS DE INFRAESTRUCTURA, EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS.....	7
4.1.1	Requisitos de infraestructura .....	7
4.1.2	Requisitos de equipamiento.....	8
4.1.3	Requisitos de materiales y reactivos .....	8
4.2	REQUISITOS DEL PERSONAL.....	10
4.2.1	Responsable técnico .....	10
4.2.2	Analista .....	11
4.3	REQUISITOS ESPECÍFICOS.....	11
4.4	MEDIOS DE VERIFICACIÓN DE REQUISITOS.....	11
5.	ANÁLISIS/ENSAYOS.....	12
5.1	CONDICIONES PREVIAS .....	12
5.2	CAPTACIÓN Y ENVÍO .....	12
5.3	RECEPCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA/CONTRAMUESTRA .....	13
5.3.1	Recepción de la muestra .....	13
5.3.2	Preparación de la muestra.....	14
5.3.3	Manejo de la contramuestra .....	15
5.4	METODOLOGÍA .....	16
5.4.1	Control de calidad interno .....	26
5.4.2	Interpretación de resultados .....	28
5.4.3	Expresión de resultados .....	29
6.	REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS.....	29
7.	SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS AUTORIZADOS .....	30
8.	MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO .....	30
9.	OBLIGACIONES.....	31
10.	FORMULARIOS.....	31

## 1. OBJETIVOS Y ALCANCE

El presente documento establece las directrices a cumplir por los/as interesados/as que voluntariamente postulen ante el SAG, para ser laboratorio de análisis/ensayo para el diagnóstico de virus y viroides fitopatógenos en tejido vegetal para el Programa de Certificación de Plantas Frutales. Asimismo, este documento entrega las condiciones que deben cumplir estos laboratorios, una vez autorizados.

El alcance de la autorización será de carácter nacional y se otorgará por hospedero (género). Cabe señalar, que el laboratorio debe realizar la totalidad de los diagnósticos de virus y viroides correspondiente al hospedero al cual postula. Y deberá diagnosticarlos según la técnica indicada por el Servicio en el acta de toma de muestras enviada al laboratorio autorizado.

Sin perjuicio de lo anterior, en caso de que el Servicio lo requiera, podrá ampliar el número de virus y/o técnicas diagnósticas que forman parte del alcance de esta autorización SAG, frente a lo cual, los laboratorios que deseen mantener su autorización en esta categoría, deberán postular a la ampliación de su autorización de acuerdo al procedimiento descrito en el numeral 13 del Reglamento Específico de Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos.

**Tabla 1.** Virus y viroides, en certificación de plantas frutales

ESPECIE / GÉNERO	VIRUS / VIROIDES	TÉCNICA DIAGNÓSTICA
<b>Especies del Género</b> <i>Ribes spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arabis mosaic virus (ArMV)</li> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV)</li> <li>• Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)</li> </ul>	DAS-ELISA y RT-PCR
<b>Especies del Género</b> <i>Rubus spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arabis mosaic virus (ArMV)</li> <li>• Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)</li> <li>• Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)</li> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV)</li> </ul>	DAS-ELISA y RT-PCR
<b>Especies del género</b> <i>Vaccinium spp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV)</li> <li>• Tobacco ringspot virus (TRSV)</li> </ul>	DAS_ELISA y RT-PCR
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blueberry mosaic associated virus (BIMaV)</li> </ul>	RT-PCR
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blueberry shoestring virus (BSSV)</li> <li>• Tobacco streak virus (TSV)</li> </ul>	DAS-ELISA
<b>Manzano</b> <i>Malus domestica Borkh</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)</li> <li>• Apple mosaic virus (ApMV)</li> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV)</li> </ul>	ELISA y/o RT-PCR
<b>Membrillo</b> <i>Cydonia oblonga Mill</i> <b>Peral</b> <i>Pyrus L.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)</li> </ul>	ELISA y/o RT-PCR

ESPECIE / GÉNERO	VIRUS / VIROIDES	TÉCNICA DIAGNÓSTICA
<b>Almendro</b> <i>Prunus dulcis</i> (Mill.) D. A. Webb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prune dwarf virus (PDV)</li> <li>• Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)</li> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV)</li> </ul>	ELISA y/o RT-PCR
<b>Cerezo</b> <i>Prunus avium</i> (L.) L. <b>Guindo</b> <i>Prunus Cereasus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prune Dwarf virus (PDV)</li> <li>• Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)</li> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV)</li> </ul>	ELISA y/o RT-PCR
<b>Ciruelo</b> <i>Prunus domestica</i> L. - <i>Prunus salicina</i> Lindl. <b>Damasco</b> <i>Prunus armeniaca</i> L. <b>Duraznero</b> <i>Prunus persica</i> (L.) Batsch <b>Nectarino</b> <i>Prunus persica</i> cv. <i>nectarina</i> (L.) Batsch	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plum Pox Virus (PPV)</li> <li>• Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)</li> <li>• Prune Dwarf virus (PDV)</li> <li>• Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)</li> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV)</li> </ul>	ELISA y/o RT-PCR
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peach latent mosaic viroid (PLMVd)</li> </ul>	RT-PCR
<b>Vides</b> <i>Vitis</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1)</li> <li>• Grapevine leafroll virus 2 (GLRaV-2)</li> <li>• Grapevine leafroll virus 3 (GLRaV-3)</li> <li>• Grapevine fan leaf virus (GFLV)</li> <li>• Grapevine virus A (GVA)</li> <li>• Grapevine virus B (GVB)</li> </ul>	ELISA y RT-PCR
<b>Olivo</b> <i>Olea europaea</i> L.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cherry leaf roll virus (CLRV)</li> <li>• Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)</li> </ul>	RT-PCR
<b>Cítricos</b> <i>Citrus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citrus tristeza virus (CTV)</li> <li>• Citrus psorosis virus (CPsV)</li> </ul>	ELISA y/o RT-PCR
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citrus exocortis viroid (CEVd)</li> <li>• Citrus cachexia viroid (CCVd)</li> </ul>	RT-PCR

## 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 N° 529, de fecha 26 de enero de 2012 del SAG, la cual norma el Sistema Nacional de Autorización de Terceros y deroga Resoluciones N° 3.678 de 2004 y N° 6.061 de 2008 de la Dirección Nacional del SAG.
- Resolución Exenta N° 90, de fecha 06 de enero de 2014, del Director Nacional del SAG, que aprueba Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos Servicio Agrícola y Ganadero. Versión vigente.
- Resolución Exenta del Director Nacional N° 10140, de fecha 30 de diciembre 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 Director Nacional N° 6551 de 2012, que establece Norma específica de certificación de materiales de propagación de carozos y pomáceas
- Resolución Exenta del Director Nacional N° 7605 del 03 de diciembre de 2013. Establece Norma Específica de Certificación de Material Vegetal de Propagación de vides (*Vitis spp.*) y Deroga Resolución N° 2411 de 2007.
- Resolución Exenta N° 10143 del 30 de diciembre de 2015, que establece Norma Específica de Certificación de Material de Propagación de olivo (*Olea europea l*) y deroga Resolución 4725 de 2007.
- Faggioli, F. et Al. Distribution of olive tree viruses in Italy as reveleated by One Step RT-PCR (2005), 87(1), 49-55.
- Servicio Agrícola y Ganadero. 1998. Resolución Exenta del Director Nacional N° 7520/2013. Establece Norma Específica de Certificación de Material Vegetal de Propagación de Cítricos y Deroga Resolución N° 134 de 1998.

### 3. DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- Laboratorio Autorizado** Laboratorio autorizado por el Servicio para ejecutar uno o más análisis/ensayos determinados, en apoyo a los programas oficiales del SAG, bajo condiciones definidas por el Reglamento Específico de Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos y los correspondientes Instructivos Técnicos.
- Analista** Persona designada por el laboratorio autorizado, para desempeñarse en temas técnicos asociados a su actividad y que cumple con el perfil definido por el Servicio para este cargo.
- Responsable Técnico** Persona designada por un laboratorio autorizado para actuar como contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad y que cumple con el perfil definido por el SAG para este cargo.
- 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.

<b>BPL</b>	<p>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.</p> <p>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.</p>
<b>ELISA</b>	<p>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.</p>
<b>DAS-ELISA</b>	<p>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.</p>
<b>PCR</b>	<p>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.</p>
<b>PCR Nested</b>	<p>PCR Nested o Anidada: Variante de la PCR convencional que consiste de dos amplificaciones, con distintos pares de partidores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de la detección.</p>
<b>RT-PCR</b>	<p>Variante de la PCR en que hebras de ARN por acción de la transcriptasa reversa generan ADN complementario que es usado como templado en una PCR convencional.</p>
<b>Fitopatógeno</b>	<p>Agente virulento, capaz de infectar una planta.</p>
<b>Servicio/SAG</b>	<p>Servicio Agrícola y Ganadero.</p>
<b>Signo</b>	<p>Presencia del agente causal en una planta enferma.</p>
<b>Síntoma</b>	<p>Expresión externa o interna de alteraciones morfológicas por la acción de un agente causal en una planta enferma.</p>
<b>CSM</b>	<p>Sistema de Semillas y Plantas Frutales, sistema en línea ingresando</p>

a la dirección web: <http://csm.sag.gob.cl>.

<b>Monitoreo</b>	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.
<b>Muestreador</b>	Persona capacitada y calificada para realizar labores de muestreo a nivel de huerto productivo.
<b>Muestreo</b>	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.
<b>Prospector/a</b>	Persona capacitada y calificada para realizar monitoreo/s a nivel de huerto productivo.
<b>Protocolo/Plan de Trabajo</b>	Documento o lineamiento establecido por el SAG en base a los requisitos de la ONPF del mercado de destino, que describe el procedimiento para las actividades de muestreo, monitoreo y análisis.
<b>Trazabilidad de la muestra</b>	Sistema de documentación que permite la identificación de la muestra desde su recolección y su posterior ingreso al laboratorio hasta la emisión del resultado.

#### **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; el laboratorio debe contar al menos con cuatro (4) salas separadas: preparación de soluciones, Extracción de ARN, 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. 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).

**b. Equipamiento para la realización de los análisis a través de la técnica RT-PCR convencional, 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 PCR.
- Balanza rango de uso 0.01 a 500 g. con una resolución de 0.1 g.
- Micro-Centrífuga (hasta 14000 r.p.m.)
- Micropipetas de 10, 100 y 1000ul, de uso exclusivo para la técnica
- Refrigerador que alcance una temperatura de 6°C+-2°C
- Conservadora de muestras a que alcance una temperatura 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 kit 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 virus indicados en el alcance indicado en la Tabla 2 descrita a continuación:

**Tabla 2.** Identificación de los kit ELISA y materiales para el diagnóstico por tipo de virus.

<b><i>Rubus spp., Ribes spp.</i> y <i>Vaccinium spp.</i></b>	<b>Carozos y Pomáceas</b>	<b>Virus en Vides (<i>Vitis</i> <i>spp.</i>)</b>	<b>Virus en Cítricos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blueberry shoestring virus (BSSV)</li> <li>• Raspberry bushy dwarf virus (RBDV).</li> <li>• Strawberry latent ringspot virus (SLRSV).</li> <li>• Arabis mosaic virus (ArMV)</li> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV).</li> <li>• Tobacco ringspot virus (TRSV).</li> <li>• Tobacco streak virus (TSV)</li> <li>• Controles positivos y negativos de los virus del alcance.</li> <li>• Placas ELISA Nunc Maxisorp.</li> <li>• Puntas de micropipetas.</li> <li>• Bolsas de extracción.</li> <li>• Tampón de extracción o reactivos necesarios para preparación.</li> <li>• Tampón de lavado o reactivos necesarios para preparación.</li> <li>• Tampones conjugados o reactivos para preparación.</li> <li>• Tampón sustrato o reactivos para preparación.</li> <li>• Sustrato p-nitrofenilfosfato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plum Pox Virus (PPV).</li> <li>• Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV).</li> <li>• Prune Dwarf virus (PDV).</li> <li>• Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV).</li> <li>• Tomato ringspot virus (ToRSV).</li> <li>• Apple mosaic virus (ApMV).</li> <li>• Controles positivos y negativos de los virus del alcance.</li> <li>• Placas ELISA Nunc Maxisorp.</li> <li>• Puntas de micropipetas.</li> <li>• Bolsas de extracción.</li> <li>• Tampón de extracción o reactivos necesarios para preparación.</li> <li>• Tampón de lavado o reactivos necesarios para preparación.</li> <li>• Tampones conjugados o reactivos para preparación.</li> <li>• Tampón sustrato o reactivos para preparación.</li> <li>• Sustrato p-nitrofenilfosfato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1).</li> <li>• Grapevine leafroll virus 2 (GLRaV-2).</li> <li>• Grapevine leafroll virus 3 (GLRaV-3).</li> <li>• Grapevine fan leaf virus (GFLV).</li> <li>• Grapevine virus A (GVA).</li> <li>• Grapevine virus B (GVB).</li> <li>• Controles positivos y negativos de los virus del alcance.</li> <li>• Placas ELISA Nunc Maxisorp.</li> <li>• Puntas de micropipetas.</li> <li>• Bolsas de extracción.</li> <li>• Tampón de extracción o reactivos necesarios para preparación.</li> <li>• Tampón de lavado o reactivos necesarios para preparación.</li> <li>• Tampones conjugados o reactivos para preparación.</li> <li>• Tampón sustrato o reactivos para preparación.</li> <li>• Sustrato p-nitrofenilfosfato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citrus Tristeza Virus (CTV), Bioreba.</li> <li>• Citrus Psorosis Virus (CPSV), Agritets.</li> <li>• Controles positivos y negativos de los virus del alcance.</li> <li>• Placas ELISA Nunc Maxisorp.</li> <li>• Puntas de micropipetas.</li> <li>• Bolsas de extracción.</li> <li>• Tampón de extracción o reactivos necesarios para preparación.</li> <li>• Tampón de lavado o reactivos necesarios para preparación.</li> <li>• Tampón conjugado o reactivo para preparación.</li> <li>• Tampón sustrato o reactivos para preparación.</li> <li>• Sustrato p-nitrofenilfosfato.</li> </ul>

**b. Para técnica RT-PCR:** debe contar con reactivo e insumo de acuerdo a los virus indicados en el alcance indicado Tabla 3 descrita a continuación:

**Tabla 3.** Identificación de reactivos e insumos para técnica de diagnóstico RT-PCR por tipo de virus.

<b><i>Rubus spp., Ribes spp. y Vaccinium spp.</i></b>	<b>Carozos y Pomáceas</b>	<b>Virus en Vides (Vitis spp.)</b>	<b>Virus en Olivos</b>	<b>Virus y viroides en Cítricos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolsa de extracción</li> <li>• Buffer de extracción</li> <li>• Microtubo de 1,5 ml</li> <li>• Agua libre de nucleasas.</li> <li>• Buffer extracción de litio</li> <li>• β mercaptoetanol</li> <li>• Acetato de potasio 6M.</li> <li>• Isopropanol</li> <li>• Etanol 70%</li> <li>• Random Primer</li> <li>• Buffer 5x</li> <li>• dNTPs 10 mM</li> <li>• DTT 0.1 mM</li> <li>• MMLuV 200 U/ul.</li> <li>• Buffer Taq Polymerasa10X</li> <li>• Taq Polymerase 5 U u/l.</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> 50 mM.</li> <li>• Partidores Anexo 2. Inciso 2.4.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolsa de extracción</li> <li>• Buffer extracción de silica</li> <li>• Microtubo de 1,5 ml</li> <li>• Sarcosina al 10%</li> <li>• β-mercaptoetanol</li> <li>• Hielo</li> <li>• Solución de NaI</li> <li>• Etanol absoluto</li> <li>• Silica.</li> <li>• Buffer de lavado</li> <li>• Agua libre de nucleasas</li> <li>• Random Primer</li> <li>• Buffer 5x</li> <li>• dNTPs 10 mM</li> <li>• DTT 0.1 mM</li> <li>• MMLuV 200 U/ul</li> <li>• Buffer Taq Polymerasa10X</li> <li>• Taq Polymerase 5 U u/l</li> <li>• Partidores Anexo 2. Inciso 2.1.</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> 50 mM.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolsa de extracción</li> <li>• Buffer extracción de silica</li> <li>• Microtubo de 1,5 ml</li> <li>• Sarcosina al 10%</li> <li>• β-mercaptoetanol</li> <li>• Hielo</li> <li>• Solución de NaI</li> <li>• Etanol absoluto</li> <li>• Silica.</li> <li>• Buffer de lavado</li> <li>• Agua libre de nucleasas</li> <li>• Random Primer</li> <li>• Buffer 5x</li> <li>• dNTPs 10 mM</li> <li>• DTT 0.1 mM</li> <li>• MMLuV 200 U/ul</li> <li>• Buffer Taq Polymerasa10X</li> <li>• Taq Polymerase 5 U u/l.</li> <li>• Partidores Anexo 2. Inciso 2.5.</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> 50 mM.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolsa de extracción</li> <li>• Buffer extracción de silica</li> <li>• Microtubo de 1,5 ml</li> <li>• Sarcosina al 10%</li> <li>• β-mercaptoetanol</li> <li>• Hielo</li> <li>• Solución de yoduro de sodio (NaI)</li> <li>• Etanol absoluto</li> <li>• Suspensión de silica.</li> <li>• Buffer de lavado</li> <li>• Agua libre de nucleasas</li> <li>• Random Primer</li> <li>• Buffer 5x</li> <li>• dNTPs 10 mM</li> <li>• DTT 0.1 mM</li> <li>• MMLuV 200 U/ul</li> <li>• Buffer Taq Polymerasa10X</li> <li>• Taq Polymerase 5 U u/l.</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> 50 mM.</li> <li>• Partidores Anexo 2. Inciso 2.2.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolsa de extracción</li> <li>• Buffer de extracción</li> <li>• Microtubo de 1,5 ml</li> <li>• Sarcosina.</li> <li>• B-mercaptoetanol</li> <li>• Hielo</li> <li>• Yoduro de sodio (NaI).</li> <li>• Etanol absoluto</li> <li>• Silica.</li> <li>• Buffer de lavado</li> <li>• Agua libre de nucleasas</li> <li>• Random Primer</li> <li>• Buffer 5x</li> <li>• dNTPs 10 mM</li> <li>• DTT 0.1 mM</li> <li>• MMLuV 200 U/ul</li> <li>• Buffer Taq Polymerasa10X</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> 50 mM</li> <li>• Taq Polymerase 5 U u/l</li> <li>• Partidores Anexo 2. Inciso 2.3.</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> 50 mM.</li> </ul>

## 4.2 Requisitos del personal

El laboratorio debe contar con el siguiente personal:

### 4.2.1 Responsable técnico

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

- 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.

#### 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 y técnicas serológicas, asimismo, para el análisis de virus en olivos, se considerará además, que el analista presente experiencia en técnicas moleculares.

El laboratorio, previendo una eventual ausencia del responsable técnico o del o los analistas, podrá postular a otras personas para que actúen en ausencia del o los titulares, en calidad de subrogante. En tal caso, el laboratorio deberá solicitarlo por escrito, presentando al Servicio 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

De acuerdo a lo dispuesto en el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos, los interesados en autorizarse para realizar el Diagnóstico de virus y viroides para la certificación de plantas frutales, deben presentar **junto a la solicitud de autorización** los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG:

1. Formulario anexo para el diagnóstico de virus y viroides, indicando el alcance y técnica a la que postule, (adjunto al presente documento).

2. Los antecedentes generales del laboratorio que se establecen en el numeral 6.1 del Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos.
3. Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos.
4. Lista de equipos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio y capacidad cuando corresponda.
5. Registros de la calibración de los equipos, según corresponda.
6. Lista de materiales, reactivos y material de referencia.
7. Formulario de identificación del responsable técnico, según formato establecido en el Reglamento Específico para la Autorización de Laboratorios de Análisis/Ensayos (F-GF-CGP-PT-069)
8. Certificado de título del responsable técnico identificado en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
9. Formulario de identificación del personal que se desempeña como analista, según formato adjunto (F-GF-CGP-PT-113).
10. Certificado de título o de egreso de los/las analistas identificados en el formulario respectivo, en original o fotocopia legalizada.
11. Documentos que acrediten la competencia técnica y/o experiencia laboral del/la responsable técnico en las áreas de virología y serológicas, técnicas moleculares, según corresponda.
12. Documentos que acrediten la competencia técnica y/o experiencia laboral de los/las analistas en las áreas de virología y serológicas y técnicas moleculares y/o, según corresponda.
13. Manual de procedimientos de acuerdo a lo señalado en el numeral 4.3 de este instructivo.
14. Manual de Procedimientos de la Metodología.

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, 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. ANÁLIS/ENSAYOS**

### **5.1 Condiciones previas**

El vivero deberá informar al Servicio a qué laboratorio autorizado se deberán enviar las muestras para ser analizadas, con el fin de coordinar la calendarización tentativa de muestreo. Dicha información, debe ser enviada a través de un correo electrónico ([cpf@sag.gob.cl](mailto:cpf@sag.gob.cl)) el cual va dirigido al Encargado(a) del Programa de Certificación de Plantas Frutales y al Encargado(a) Regional de Semillas.

### **5.2 Captación y Envío**

El muestreo será realizado por personal del SAG o por una Empresa Externa autorizada por el Servicio, de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Servicio, por lo tanto no es una actividad de responsabilidad de los laboratorios autorizados en esta especialidad.

El despacho de la(s) muestra(s), será de responsabilidad del funcionario de la oficina SAG sectorial a cargo del muestreo o del funcionario de la empresa externa autorizado por el Servicio, garantizando el envío en el tiempo y las condiciones de temperatura adecuados (mantención de

cadena de frío de ser necesario), según los requerimientos específicos establecidos en el presente instructivo.

Los costos asociados al despacho de la encomienda, serán de cargo al laboratorio de destino de la(s) muestra(s) a analizar, por lo que el envío se efectuará, según sea el caso, de la siguiente manera:

- i. Cargado a un número de cuenta, previamente informado al Servicio o al tercero muestreador autorizado (de acuerdo a documento según formato establecido en formulario F-GF-CGP-PT-085), en caso de existir un convenio entre el laboratorio autorizado y una empresa de transporte de encomiendas, o,
- ii. Por cobrar al laboratorio autorizado, si al momento de efectuar el envío, el laboratorio de destino no posea, o el Servicio no esté en conocimiento de la existencia del convenio antes descrito. En este caso, el SAG se reserva el derecho de envío a través de una empresa de transporte de encomiendas que asegure adecuadas condiciones de traslado, siendo obligatoriedad por parte del laboratorio, recepcionar la(s) muestra(s) y pagar la tarifa correspondiente.

El laboratorio autorizado, deberá gestionar la devolución de las cajas de transporte de muestras, enviando correo a [cpf@sag.gob.cl](mailto:cpf@sag.gob.cl), quienes informarán el proceder.

### **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 EN MATERIAL VEGETAL DE PROPAGACIÓN DE PLANTAS DE \_\_\_\_\_ (indicar el material vegetal).

Toda muestra debe ingresar al laboratorio autorizado con su correspondiente identificación (código de barras, número de solicitud o correlativo numérico) y acompañada por el "Acta de Toma de Muestras", donde se indica la técnica diagnóstica que el laboratorio autorizado debe ejecutar, de acuerdo a las técnicas indicadas en la Tabla 1, generada por el Sistema en línea de Semillas y Plantas Frutales u otro que estime pertinente el Servicio, acompañada (de ser necesario) por el "Formulario oficial para el envío de muestras vegetales y de suelo".

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. Además, debe comprobar que la información contenida en el formulario oficial esté completa y que el número de folio y correlativo señalado, coincidan con la rotulación de la etiqueta de identificación de cada una de las muestras, así como

	<b>Instructivo Técnico para el diagnóstico de virus y viroides en tejido vegetal para el Programa de Certificación de Plantas Frutales</b>	Código: D-GF-CGP-PT-037 Versión: 01
--	--	--

también con la cantidad de muestras recibidas. Una vez verificado lo anterior, el recepcionista del laboratorio, dejará constancia de esto, mediante timbre y firma del formulario oficial, indicando además la fecha y hora de recepción, quedándose el laboratorio autorizado con una copia de este formulario y del documento o guía de despacho de la empresa de encomiendas.

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

Las muestras, se deberán conservar, hasta el momento del análisis, a una temperatura de 6°C ± 2°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.

En caso que las muestras no vengán acompañadas por todos sus documentos, que la información esté incompleta, no coincida y/o en caso de rechazo de muestras, se debe avisar en forma escrita de tal situación vía correo electrónico y de manera simultánea, al correo [cpf@sag.gob.cl](mailto:cpf@sag.gob.cl) y al Encargado Regional de Semillas correspondiente al origen de la muestra. En éste documento, se deberá indicar el problema, identificando el número de folio del Protocolo, el o los números correlativos de las muestras (esto dentro de un plazo máximo de 1 día corridos, contados desde la recepción de la muestra por parte del laboratorio autorizado) y solicitar las medidas a seguir (corrección del problema o envío de nueva muestra, según corresponda).

Una vez que el laboratorio autorizado ha verificado los términos documentales y la condición analítica de la muestra, deberá ingresar al sistema en línea (<http://csm.sag.gob.cl>) el número de folio del Acta de Toma de Muestras, para validar los patógenos a analizar.

### 5.3.2 Preparación de la muestra

En la siguiente Tabla 4, se indica la preparación de la muestra por categoría del alcance indicado en el presente documento

**Tabla 4:** Preparación de la muestra por tipo de virus y de análisis a realizar

<b><i>Rubus spp., Ribes spp. y Vaccinium spp.</i></b>	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.  En caso 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 para <i>Vaccinium spp.</i> , <i>Rubus spp.</i> y <i>Ribes spp.</i>
<b>Carozos y Pomáceas</b>	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.  En caso que se requiera la detección de virus o viroide por RT-PCR, se tomarán 0,1 g de tejido de hojas que se extraerán por el método de la sílica.
<b>Virus en Vides (<i>Vitis spp.</i>)</b>	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.

	<b>Instructivo Técnico para el diagnóstico de virus y viroides en tejido vegetal para el Programa de Certificación de Plantas Frutales</b>	Código: D-GF-CGP-PT-037 Versión: 01
--	--	--

	En caso que se requiera la detección de virus por RT-PCR, se tomaran 0,1 g. de tejido de hojas que se extraerán por el método de la sílica.
<b>Virus en Olivos</b>	Para las muestras que requieran la detección de los virus CLRV y SLRSV por RT-PCR, se tomaran 0,1 g de tejido floemático de ramillas que se extraerán por el método de la sílica.
<b>Virus en Cítricos</b>	Para las muestras que requieran la detección de CTV por ELISA, se tomaran 0,5 g de tejido foliar y se extraerán de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit de anticuerpos utilizado. En caso que se requiera la detección de virus o viroides por RT-PCR, se tomaran 0,1 g de tejido floemático de ramillas que se extraerán por el método de la sílica.

### 5.3.3 Manejo de la contramuestra

En la tabla 5, se indica la preparación de la muestra por categoría del alcance indicado en el presente documento.

**Tabla 5.** Manejo de la contramuestra por tipo de virus.

<b><i>Rubus spp., Ribes spp. y Vaccinium spp.</i></b>	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 $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Además, para las muestras positivas, se deberá conservar tejido a $-20^{\circ}\text{C}$ por al menos tres meses, posteriores a la recepción de la muestra.
<b>Carozos y Pomáceas</b>	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 $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Además, para las muestras positivas, se deberá conservar tejido a $-20^{\circ}\text{C}$ por al menos tres meses, posteriores a la recepción de la muestra.
<b>Virus en Vides (Vitis spp.)</b>	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 $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Además, para las muestras positivas, se deberá conservar tejido a $-20^{\circ}\text{C}$ por al menos tres meses, posteriores a la recepción de la muestra.
<b>Virus en Olivos</b>	Se deberá mantener contramuestra de tejido vegetal de las muestras originales y de las extracciones de ARN, a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por al menos 6 meses, después de realizado el análisis.
<b>Virus en Cítricos</b>	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, luego del análisis. El mantenimiento se deberá realizar a una temperatura de $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Además para las muestras positivas, se deberá conservar tejido $-20^{\circ}\text{C}$ por al menos tres meses, después de la recepción de la muestra.

## 5.4 Metodología

### a. Por ELISA

#### i. Extracción de RNA por el Método de la Captura con silica para detección de virus y viroides en cítricos, *Vitis spp.*, *Olea europea L*, carozos y pomáceas.

1. Rotule cada una de las bolsas plásticas con número de extracción, de tal manera que permita identificar la muestra.
2. Rotule los tubos nuevos de 1,5 ml, de tal manera que permita la trazabilidad de la muestra.
3. Pesar 0.1 gramo de tejido (hoja/ floema), introducir en bolsa de extracción, agregar 1 ml. de buffer de extracción y macerar.
4. 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  $\mu$ l  $\beta$  – mercaptoetanol.
5. Incubar 10 minutos a 70° C con agitaciones cada 2 minutos.
6. Traspasar a hielo por 2 minutos y luego centrifugar a 12.000 rpm. por 5 minutos.
7. Transferir 0.3 ml. del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y agregar 300  $\mu$ l de solución de NaI, 150  $\mu$ l de etanol absoluto y 25  $\mu$ l de suspensión de partículas de silica. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos con agitaciones cada 2 minutos.
8. Centrifugar a 6000 rpm. durante 1 minuto y eliminar el sobrenadante.
9. Agregar 0.5 ml. de buffer de lavado y agitar en vortex hasta resuspender el pellet.
10. Repetir el paso N° 6.
11. Eliminar el sobrenadante con cuidado y secar el pellet a temperatura ambiente invirtiendo el tubo.
12. Resuspender el pellet en 0.1 ml. de agua libre de nucleasas e incubarlo durante 2 minutos a 70°C.
13. Centrifugar a velocidad máxima durante 3 minutos y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo, teniendo cuidado de no arrastrar silica.
14. El RNA extraído se almacena a -80° C, hasta su uso.

#### ii. Extracción de RNA por el Método de extracción con Litio para detección de virus en *Vaccinium spp.*, *Rubus spp.* y *Ribes spp.* (Hughes D.W., Galau G. 1988.)

1. Rotule cada una de las bolsas plásticas con número de extracción, de tal manera que permita identificar la muestra.
2. Rotule los tubos nuevos de 1,5 ml, de tal manera que permita la trazabilidad de la muestra.
3. Pese 0,1 gr. de tejido e introduzca la muestra en la bolsa.
4. Agregue 1 ml de buffer de extracción de litio con  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final del 0,1 %.
5. Macere la muestra con ayuda del equipo molidor "Homex".
6. Transfiera 600  $\mu$ l del macerado al tubo previamente rotulado y adicione 600  $\mu$ l de acetato de potasio 6M.
7. Agite el tubo por inversión al menos 10 veces.
8. Centrifugue a 13.000 rpm durante 10 minutos.
9. Rotule tubos nuevos de 1,5 ml, de tal manera que permita la trazabilidad de la muestra.
10. Transfiera 750  $\mu$ l del sobrenadante al nuevo tubo y agregue 750  $\mu$ l de Isopropanol.
11. Agite el tubo por inversión al menos 10 veces.
12. Centrifugue a 14.000 rpm durante 20 minutos.
13. Elimine el sobrenadante con cuidado y lavar el pellet con 1 ml de etanol 70% frio.



	<b>Instructivo Técnico para el diagnóstico de virus y viroides en tejido vegetal para el Programa de Certificación de Plantas Frutales</b>	Código: D-GF-CGP-PT-037 Versión: 01
--	--	--

14. Centrifugue a 14.000 rpm durante 10 minutos.
15. Eliminar el sobrenadante con cuidado y deje secar el pellet durante al menos 1 hora a temperatura ambiente.
16. Resuspenda el pellet en 40 µl de agua libre de nucleasas.
17. Los ácidos nucleicos extraídos son almacenados a -20° C, hasta su uso.

La metodología de análisis a utilizar, deberá seguir las especificaciones técnicas (diluciones, tiempos de incubación, etc) del fabricante de cada tipo de Kit, indicado en la Tabla 6.

Tabla 6. Kit marca Elisa por tipo de virus

<b>Género</b>	<b>Virus</b>	<b>Marca ELISA</b>
<b>Rubus spp., Ribes spp. y Vaccinium spp.</b>	Arabis mosaic virus (ArMV)	Agdia, Bioreba
	Tomato ringspot virus (ToRSV)	Agdia, Prime Diagnostic
	Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)	Bioreba
	Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)	Bioreba
	Blueberry shoestring virus (BSSV)	AC Diagnostic
	Tobacco streak virus (TSV)	Agdia, Bioreba
	Tobacco ringspot virus (TRSV)	Agdia, Bioreba
<b>Carozos y Pomáceas</b>	Plum pox virus (PPV)	Agdia
	Tomato ringspot virus (ToRSV)	Agdia / Prime
	Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)	Bioreba / Prime
	Prune Dwarf virus (PDV)	Bioreba
	Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV)	Bioreba
	Apple mosaic virus (ApMV)	Bioreba
<b>Virus en Vides (Vitis spp.)</b>	GLRaV-1	Bioreba
	GLRaV-2	Bioreba
	GLRaV-3	Bioreba
	GFLV	Bioreba
	GVA	Bioreba, Agritest
	GVB	Agritest
<b>Virus en Cítricos</b>	Citrus Tristeza Virus CTV	Bioreba

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 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 kit 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. Por RT-PCR**

El diagnóstico de los virus y viroides del alcance de éste instructivo, por la técnica molecular de RT-PCR en dos pasos, consiste en términos generales en la extracción de ARN total a partir de lo indicado en el punto 5.3.2 de éste documento, 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.

### **i. Metodología para *Prunus spp* y pomáceas.**

#### **Amplificación por RT-PCR en dos etapas.**

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mezcla Denaturación por tubo:

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
RNA	10
Random Primer 0.3 ug/ul	2
Agua libre de nucleasas	18
Volumen Total	20

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 30 ul de mezcla de síntesis.

<i>Mezcla de Síntesis</i>	Vol. (µl)
<i>Reactivo</i>	
Buffer 5x	10.0
dNTPs 10 mM	2.5
DTT 0.1 mM	2.4
MMLuV 200 U/ul	0.5
Agua libre de nucleasas	4.6

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Para la amplificación de los distintos virus y viroide, se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas en la siguiente tabla:

<b>Virus</b>	<b>T° de Annealing (T° A)</b>	<b>secuencia</b>
ACLSV (f)	50	CCA TCT TCG CGA ACA TAG C
ACLSV (r)	50	GTC TAC AGG CTA TTT ATT ATA AG
PDV (f)	50	CAA CGT AGG AAG TTC ACA G
PDV (r)	50	GCA TCC CTT AAA GGG GCA TC
PNRSV (f)	50	GAA CCT CCT TCC GAT TTA G
PNRSV (r)	50	GCT TCC CTA ACG GGG CAT CCA AC
ApMV (f)	50	CGT GAG GAA GTT TAG GTT G
ApMV (r)	50	GCC TCC TAA TCG GGG CAT CAA
PPV (f)	60	ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC
PPV (r)	60	CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA
ToRSV (f)	55	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC
ToRSV (r)	55	TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA
PLMVd (f)	55	CCC GAT AGA AAG GCT AAG CAC CTC G
PLMVd (r)	55	AAC TGC AGT GCT CCG T

Mezcla de Reacción por tubo:

<i>Reactivo</i>	<i>Vol. (µl)</i>
Buffer Taq Polymerasa10X	2.5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2.0 (1.5 para PLMVd)
dNTP's 10 mM	0.5
Primer (f)	10 µM 0.5
Primer (r)	10 µM 0.5
Taq Polymerase 5 U u/l	0.2
Agua libre de nucleasas	16.25
Volumen Total	25

Agregar 2.5µl de cDNA obtenido previamente, agitar, dar spin y colocar los tubos en el termociclador.

Poner en marcha el programa PCR que consiste en:

- 94°C por 5 minutos.
- 39 ciclos de: 94 °C por 45 seg., T° A por 45 seg. y 72°C por 45 seg.
- 72°C por 5 minutos.
- 4 °C por tiempo indefinido.

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X. Una muestra será positiva, si se aprecia una banda del tamaño esperado de acuerdo a lo indicado en la tabla anterior y negativa, si no se visualiza la banda del tamaño esperado.

## ii. Metodología para Olivo.

### Amplificación por RT-PCR en dos etapas

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de coctel).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mezcla Denaturación por tubo:

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
RNA	5
Random Primer 0.3 ug/ul	1
Agua libre de nucleasas	9
Volumen Total	15

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 10 ul de mezcla de síntesis.

Mezcla de Síntesis		
<i>Reactivo</i>		Vol. (µl)
Buffer 5x		5
dNTPs 10 mM		1.25
DTT 0.1 mM		1.2
MMLuV	200 U/ul	1
Agua libre de nucleasas		1.55

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

La amplificación de CLRV se realiza con partidores descritos por Werner y colab., 1997 (CLRV-5 5' TGGCGACCGTGTAACGGCA3' / CLRV-3 r 5'-GTCGGAAAGATTACGTAAAAGG-3') que amplifica un producto de 416 bp a una temperatura annealing 55°C. Para la amplificación de SLRSV, se utilizan los partidores descritos por Faggioli y colab., 2002 (SLRSV-5D 5'-CCC TTG GTT ACT TTT ACC TCC TCA TTG TCC-3' / SLRSV 3D 5'-AGG CTC AAG AAA ACA CAC-3') que amplifican un producto de PCR de 293 bp a una temperatura annealing 55°C.

Mezcla de Reacción por tubo:

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
Buffer Taq Polymerasa10X	2.5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5
dNTP's 10 mM	1
Primer (f) 10 µM	1
Primer (r) 10 µM	1
Taq Polymerase 5 U u/l	0.25
Volumen Total	25

Agregar 1.5µl de cDNA obtenido previamente, agitar, dar spin y colocar los tubos en el termociclador.

Poner en marcha el programa PCR que consiste en:

94°C por 5 minutos.

39 ciclos de: 94 °C por 45 seg., 55 °C por 45 seg. y 72°C por 45 seg.

72°C por 5 minutos.

4 °C por tiempo indefinido.

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X. Una muestra será positiva, si se aprecia una banda del tamaño esperado de acuerdo a lo indicado previamente y negativa, si no se visualiza la banda del tamaño esperado.

### **iii. Metodología para cítricos:**

Amplificación por RT-PCR en dos etapas.

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mezcla Denaturación por tubo:

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
RNA	5
Random Primer 0.3 ug/ul	1
Agua libre de nucleasas	9
Volumen Total	15

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 10 ul de mezcla de síntesis.

Mezcla de Síntesis

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
Buffer 5x	5
dNTPs 10 mM	1.25

DTT 0.1 mM	1.2
MMLuV 200 U/ul	1
Agua libre de nucleasas	1.55

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Para la amplificación de los virus y viroides, se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas en la siguiente tabla:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bp)
CTV(f)	55	ATG GAC GAC GAA ACA AAG AAA T	Hilf <i>et al.</i> (2005) 672 bp
CTV(r)	55	TCA ACG TGT GTT GAA TTT CCC A	
CPsV (f)	50	GCT TCC TGG AAA AGC TGA TG	Barthe <i>et al.</i> (1998) 600 bp
CPsV(r)	50	TCT GTT TTT GTC AAC ACA CTC C	
CEVd (f)	55	GGA AAC CTG GAG GAA GTC GAG	Gross <i>et al.</i> (1982) 371 bp
CEVd (r)	55	CCG GGG ATC CCT GAA GGA CTT	
HSVd (f)	55	GGCAACTCTTCTCAGAATCCAGC	Sano <i>et al.</i> , (1988) 269 bp
HSVd (r)	55	CCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAGT	

Mezcla de Reacción por tubo:

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
Buffer Taq Polymerasa10X	2.5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5
dNTP's 10 mM	1
Primer (f) 10 µM	1
Primer (r) 10 µM	1
Taq Polymerase 5 U u/l	0.25
Volumen Total	25

Agregar 1.5µl de cDNA obtenido previamente, agitar, dar spin y colocar los tubos en el termociclador.

Poner en marcha el programa PCR que consiste en:

- 94°C por 5 minutos.
- 39 ciclos de: 94 °C por 45 seg., T° A por 45 seg. y 72°C por 45 seg.
- 72°C por 5 minutos.
- 4 °C por tiempo indefinido.

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X. Una muestra será positiva, si se aprecia una banda del tamaño esperado de acuerdo a lo indicado en la tabla anterior y negativa, si no se visualiza la banda del tamaño esperado.

#### iv. Metodología para *Rubus spp.*, *Ribes spp.*, y *Vaccinium spp.*

Amplificación por RT-PCR en dos etapas.

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mezcla Denaturación por tubo:

Reactivo	Vol. (µl)
RNA	10 (1/10)
Random Primer 0.3 ug/ul	2
Agua libre de nucleasas	18
Volumen Total	20

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 30 ul de mezcla de síntesis.

Mezcla de Sintesis

Reactivo	Vol. (µl)
Buffer 5x	10.0
dNTPs 10 mM	2.5
DTT 0.1 mM	2.4
MMLuV 200 U/ul	1.0
Agua libre de nucleasas	14.1

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Para la amplificación de los virus, se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas en la siguiente tabla:

Virus	T° de Annealing (T° A)	Secuencia de los partidores (5' -3')	Referencia / tamaño esperado (bP)
ARMV-5A	50	TAC TAT AAG AAA CCG CTC CC	Faggioli y colab., 2005
ARMV-3A	50	CAT CAA AAC TCA TAA CCC AC	302 bp
SLRSV-F	50	CCT CTC CAA CCT GCT AGA CT	Postman y colab., 2004
SLRSV-R	50	AAG CGC ATG AAG GTG TAA CT	497 bp
ToRSV-U1	55	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	Griesbach y colab., 1995
ToRSV-D1	55	TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA	
TRSV-f	50	CAG GGG CGT GAG TGG GGG CTC	Fuchs y colab., 2010
TRSV-r	50	CAA TAC GGT AAG TGC ACA CCC CG	320 bp

Mezcla de Reacción por tubo:

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
Buffer Taq Polymerasa10X	2.5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5
dNTP's 10 mM	1.0
Primer (f) 10 µM	1.0
Primer (r) 10 µM	1.0
Taq Polymerase 5 U u/l	0.25
Agua libre de nucleasas	16.25
Volumen Total	25

Agregar 1.5µl de cDNA obtenido previamente, agitar, dar spin y colocar los tubos en el termociclador.

Poner en marcha el programa PCR que consiste en :

94°C por 5 minutos.

39 ciclos de: 94 °C por 45 seg., 55 °C por 45 seg. y 72°C por 45 seg.

72°C por 5 minutos.

4 °C por tiempo indefinido.

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X. Una muestra será positiva, si se aprecia una banda del tamaño esperado de acuerdo a lo indicado en la tabla anterior y negativa, si no se visualiza la banda del tamaño esperado.

#### **v. Metodología para *Vitis spp.***

Amplificación por RT-PCR en dos etapas

Se deben incluir en cada tanda de RT-PCR controles positivo, negativo y un control de agua (control de mezcla).

Primer Paso: Síntesis de cDNA.

Mezcla Denaturación por tubo:

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
RNA	10
Random Primer 0.3 ug/ul	1
Agua libre de nucleasas	19
Volumen Total	30

Incubar a 95°C por 5 min., pasar a hielo por 3 min, realizar spin y agregar 30 ul de mezcla de síntesis.



Mezcla de Síntesis	
<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
Buffer 5x	10.0
dNTPs 10 mM	2.5
DTT 0.1 mM	2.4
MMLuV 200 U/ul	1.0
Agua libre de nucleasas	4.1

Luego incubar a 42°C por 1 hora, el cDNA obtenido, se usa de inmediato o se guarda a -20°C hasta su uso.

Segundo paso: Amplificación por PCR.

Para la amplificación de los distintos virus se utilizan los partidores y las temperaturas de annealing indicadas en la siguiente tabla:

<b>Virus</b>	<b>T° de Annealing (T° A)</b>	<b>Secuencia de los partidores (5' -3')</b>	<b>Referencia / tamaño esperado (bp)</b>
GLRa1V (f)	55	CGT TCG CGT TAC CCA CGC TGC CTA	Good and Monis 2001. 150 bp
GLRa1V (r)	55	GCT GGC AAA CCT GGT GGA CCT TAC ATC	
GLRa2V (f)	55	ACG GTG TGC TAT AGT GCG TG	Bertazon and Angelini 2004 589 bp
GLRa2V (r)	55	GCA GCT AAG TAC GAA TCT TC	Turturo et Al 2005 546 bp
GLRa3V (f)	52	CGC TCA TGG TGA AAG CAG ACG	
GLRa3V (r)	52	CTT AGA ACA AAA ATA TGG AGC AG	Minafra et Al 1997 430 bp
GVA (f)	52	GAC AAA TGG CAC ACT ACG	
GVA (r)	52	AAG CCT GAC CTA GTC ATC TTG G	MacKenzie 1997 235 bp
GVA(f)	52	AGG TCC ACG TTT GCT AAG	
GVA (r)	52	CAT CGT CTG AGG TTT CTA CTA	Minafra and Hadidi 1994 469 bp
GVB(f)	52	GTG CTA AGA ACG TCT TCA CAG C	
GVB(r)	52	ATC AGC AAA CAC GCT TGA ACC G	Shi et Al 2003 315 bp
GFkV(f)	55	TGG TCC TCG GCC CAG TGA AAA AGT A	
GFkV(r)	55	GGC CAG GTT GTA GTC GGT GTT GTC	Griesbach 1995 449 bp
ToRSV (f)	55	GAC GAA GTT ATC AAT GGC AGC	
ToRSV (r)	55	TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA	

Mezcla de Reacción por tubo:

<i>Reactivo</i>	Vol. (µl)
Buffer Taq Polymerasa10X	2.5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5
dNTP's 10 mM	1.0
Primer (f) 10 µM	1.0
Primer (r) 10 µM	1.0
Taq Polymerase 5 U u/l	0.25

Agua libre de nucleasas	16.25
Volumen Total	25

Agregar 2.5µl de cDNA obtenido previamente, agitar, dar spin y colocar los tubos en el termociclador.

Poner en marcha el programa PCR que consiste en:

94°C por 5 minutos.

39 ciclos de: 94 °C por 30 seg., T° A por 30 seg. y 72°C por 45 seg.

72°C por 5 minutos.

4 °C por tiempo indefinido.

Los productos de amplificación obtenidos son sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1,6% y TAE 1X. Una muestra será positiva, si se aprecia una banda del tamaño esperado de acuerdo a lo indicado en la tabla anterior y negativa, si no se visualiza la banda del tamaño esperado

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.

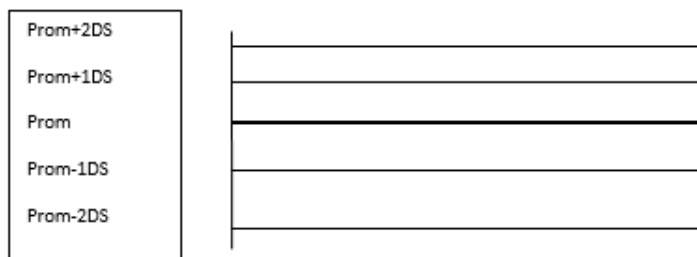
#### **5.4.1 Control de calidad interno**

##### **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.
- 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 (indicado en la Tabla 7) y tanto la muestra control negativa, como el control de mezcla PCR, no deben presentar banda a la altura esperada para el amplificado viral.

**Tabla 7.** Control de calidad interno para el tamaño esperado

Género / Especie	Virus	Tamaño esperado del Producto de PCR (bp)
Especies de los géneros <i>Ribes spp.</i> <i>Rubus spp.</i> y <i>Vaccinium spp.</i>	ArMV	302
	ToRSV	449
	TRSV	320
	SLRSV	497
Carozos y Pomáceas  <i>Prunus persica (L.) Batsch /</i> <i>Prunus persica cv. Nectarina (L.) Batsch /</i> <i>Prunus armeniaca L. /</i> <i>Prunus dulcis (Mill.) D. A. Webb /</i> <i>Prunus domestica L. /</i> <i>Prunus salicina Lindl. /</i> <i>Prunus Avium</i>	ApMV	417
	ToRSV	449
	ACLSV	632
	PPV	243
	PNRSV	346
	PDV	517
	PLMVd	336
Vides <i>Vitis spp.</i>	GLRaV-1	150
	GLRaV-2	589
	GLRaV-3	546
	GFLV	290
	GVA	430/ 235
	GVB	469
Olivos <i>Olea europaea L.</i>	CLRV	416
	SLRSV	293
Cítricos <i>Citrus spp.</i>	CTV	672
	CPsV	600
	CEVd	371
	CCVd	269

#### 5.4.2 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 vuelve a repetir 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 indicado en la Tabla 6.
- 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.

#### **5.4.3 Expresión de resultados**

Los resultados para ambas técnicas diagnósticas DAS-ELISA y RT-PCR, 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.

### **6. REGISTRO Y ENVÍO DE LOS RESULTADOS**

El laboratorio deberá contar con un libro de registro y/o planilla digital formato tipo Excel de 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.

Los resultados correspondientes, se ingresaran e informaran a través sistema en línea (<http://csm.sag.gob.cl>), en un plazo de 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](mailto: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.

En caso que el laboratorio autorizado prevea cualquier atraso en el tiempo de respuesta de alguna muestra, deberá informarlo con 24 horas de anticipación a la fecha límite de respuesta, vía correo electrónico, al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio con copia al correo electrónico [cpf@sag.gob.cl](mailto:cpf@sag.gob.cl), 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.

Cualquier información obtenida producto del proceso de análisis (resultados parciales o totales u otro), será de carácter confidencial entre el laboratorio autorizado y el SAG, en caso de no

respetarse lo anterior, sin previa autorización del Servicio, será considerado como una no conformidad crítica y causal de suspensión inmediata de la condición de autorizado.

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

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

El Encargado de Supervisión SAG del Laboratorio Autorizado, podrá solicitar a este último en cualquier momento, el envío de contramuestras, ya sea tejido vegetal y/o extracción (acorde a lo indicado en el punto 5.3.2 de este instructivo), para ser analizados por el SAG. En el caso de no haber concordancia con los resultados, se programará una visita de supervisión adicional para verificar la conducción del ensayo y determinar las medidas que correspondan.

Si producto de las acciones de supervisión, se detectan faltas en el desempeño del Laboratorio Autorizado, que afecten negativamente el resultado del Programa de Certificación de plantas frutales asociado a su autorización, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al Laboratorio Autorizado mediante una carta suscrita por el/la Jefe(a) del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias, Director(a) Regional y/o Jefe(a) de Oficina Sectorial, el cese inmediato de prestaciones de servicios ejecutados en el alcance de su autorización hasta que el SAG resuelva en definitiva su caso.

## **8. MEDIDAS POR INCUMPLIMIENTO**

En caso de detectarse algún incumplimiento o hallazgo durante las supervisiones, se procederá a evaluar la criticidad del mismo, por lo cual el autorizado quedará afecto a la aplicación de medidas por incumplimiento dependiendo del tipo de incumplimiento en el marco de las obligaciones de su actividad.

Las medidas que se pueden aplicar ante la detección de incumplimientos son:

- Suspensión de la autorización.
- Revocación de la autorización.

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

Cabe señalar, que en caso de detectar incumplimientos moderados, el supervisor podrá consignar en el acta de supervisión correspondiente, una amonestación por escrito y establecerá un plazo para solucionar el hallazgo. En caso que el incumplimiento no sea subsanado, en el plazo establecido, se aplicará la medida por incumplimiento que corresponda.

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 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.

En caso de **revocación**, el laboratorio autorizado afecto a tal medida, quedará inhabilitado para postular nuevamente a esta autorización, **por el plazo de 2 (dos) años**, contados desde que quede ejecutoriada la resolución que la establece.

## 9. OBLIGACIONES

El laboratorio autorizado ante el SAG para la ejecución de labores pertinentes al diagnóstico asociado al presente documento, tendrá las obligaciones señaladas en el numeral 7 de la última versión del Reglamento Específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayos.

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.

En caso de cambio o término abrupto de convenio con empresa de transporte de encomienda por parte del laboratorio autorizado, este deberá dar aviso formal por escrito vía correo electrónico en forma inmediata al Encargado de Supervisión SAG de ese laboratorio con copia al correo electrónico cfp@sag.gob.cl.

No podrá ejercer como laboratorio autorizado para el diagnóstico de virus y viroides para la certificación de plantas frutales, 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.

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

## 10. FORMULARIOS

Código	Nombre
F-GF-CGP-PT-160	Formulario anexo para el diagnóstico de virus y viroides, para la certificación de plantas frutales
F-GF-CGP-PT-113	Formulario de identificación del personal vinculado al/los análisis
F-GF-CGP-PT-085	Empresa(s) de transporte de encomiendas o courier en convenio
F-GF-CGP-PT-161	Declaración jurada para la designación del laboratorio autorizado
F-GF-CGP-PT-162	Formulario recepción de muestras

**FORMULARIO ANEXO  
DIAGNÓSTICO DE VIRUS Y VIROIDES, PARA LA  
CERTIFICACIÓN DE PLANTAS FRUTALES**

Código: F-GF-CGP-PT-160  
Versión:01

Identificación del laboratorio:

Nombre/razón social: .....

Cédula de identidad N°/RUT: .....

Marque con una "X" el género / especie a la que postula:

<b>GÉNERO / ESPECIE</b>	
<b>Especies</b> - <i>Ribes spp.</i>	
<b>Especies</b> - <i>Rubus spp.</i>	
<b>Especies</b> - <i>Vaccinium spp.</i>	
<b>Manzano</b> - <i>Malus domestica Borkh</i>	
<b>Membrillo</b> - <i>Cydonia oblonga Mill</i>	
<b>Peral</b> - <i>Pyrus L.</i>	
<b>Almendro</b> - <i>Prunus dulcis (Mill.) D. A. Webb</i>	
<b>Cerezo</b> - <i>Prunus avium (L.) L.</i>	
<b>Guindo</b> - <i>Prunus Cereasus</i>	
<b>Ciruelo</b> - <i>Prunus domestica L. -Prunus salicina Lindl.</i>	
<b>Damasco</b> - <i>Prunus armeniaca L.</i>	
<b>Duraznero</b> - <i>Prunus persica (L.) Batsch</i>	
<b>Nectarino</b> - <i>Prunus persica cv. nectarina(L.) Batsch</i>	
<b>Vides</b> - <i>Vitis spp.</i>	
<b>Olivo</b> - <i>Olea europaea L.</i>	
<b>Cítricos</b> - <i>Citrus spp.</i>	

\_\_\_\_\_  
Nombre o representante legal  
Laboratorio autorizado

Fecha: \_\_\_\_\_





**DECLARACIÓN JURADA PARA LA DESIGNACIÓN DEL LABORATORIO AUTORIZADO PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS**

Código: F-GF-CGP-PT-161  
Versión:01

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

1- Que todas las muestras vegetales obtenidas para los análisis virológicos obtenidas desde los predios que están ubicados en la comuna de ..... deberán ser enviadas al siguiente laboratorio autorizado para que realice el diagnóstico de virus :

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

2- Que ante una modificación en la designación del laboratorio autorizado, informaré a la Oficina SAG correspondiente al origen de la muestra, con copia al correo electrónico [cpf@sag.gob.cl](mailto:cpf@sag.gob.cl) en un plazo no superior a 48 horas, el nombre del nuevo laboratorio autorizado al cual el Servicio deberá enviar las muestras.

\_\_\_\_\_  
Personal encargado  
Empresa multiplicadora

\_\_\_\_\_  
Nombre o representante legal  
Laboratorio autorizado

Fecha recepción SAG:.....



## FORMULARIO RECEPCIÓN DE MUESTRAS

Código: F-GF-CGP-PT-162  
Versión:01

### Logo Laboratorio Autorizado

<b>Fecha aviso</b>	
--------------------	--

ANTECEDENTES TERCERO AUTORIZADO (Emisor)	
<b>Nombre Laboratorio Autorizado</b>	
<b>Nombre Responsable Técnico</b>	
<b>Dirección Oficina/ Comuna</b>	
<b>Teléfono (s) (fijo/ móvil)</b>	
<b>Correo electrónico</b>	

ANTECEDENTES SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (Uso exclusivo SAG)			
<b>Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias – UNIDAD VIROLOGÍA</b>			
<b>Nombre Funcionario Receptor</b>			
<b>Firma Funcionario Receptor</b>		<b>Fecha Recepción</b>	

ANTECEDENTES RECEPCION MUESTRAS				
Informo a usted que a partir de _____ (indicar fecha) se han empezado a recepcionar muestras vegetales para _____ diagnóstico de: _____, correspondientes a temporada _____ / _____, de acuerdo al siguiente detalle:				
<b>N° de Folio del acta de toma de muestras</b>	<b>REGION</b>	<b>COMUNA</b>	<b>Oficina SAG que envía Muestra</b>	

<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>RESPONSABLE TECNICO LABORATORIO</b>	

**FORMULARIO DE IDENTIFICACIÓN DE  
EMPRESA/S DE TRANSPORTE DE  
ENCOMIENDAS O COURIER EN CONVENIO**

Código: F-GF-CGP-PT-085

Versión:01

Identificación del laboratorio:

Nombre/razón social: .....

Cédula de identidad N°/RUT: .....

Nombre Empresa	Número de Cuenta	Fecha de convenio	Fono contacto

-----  
Firma del postulante o representante legal

Fecha,.....



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

Código: F-GF-CGP-PT-113  
Versión:01

Identificación del laboratorio:

Nombre/razón social: .....

Cédula de identidad N°/RUT: .....

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

.....  
Firma del postulante o del representante legal

Fecha: .....