



Avances en Investigación Agropecuaria
ISSN: 0188-7890
revaia@ucol.mx
Universidad de Colima
México

Puntos críticos para la acreditación de ensayos en laboratorios de sanidad forestal

Gally, M., Teresa; Giachino, Victoria; Craig, Elena

Puntos críticos para la acreditación de ensayos en laboratorios de sanidad forestal

Avances en Investigación Agropecuaria, vol. 20, núm. 3, 2016

Universidad de Colima, México

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83754344003>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional.

Puntos críticos para la acreditación de ensayos en laboratorios de sanidad forestal

Critical points for the accreditation of testing laboratories forest health

Teresa Gally, M.
Universidad Nacional de Luján, Argentina
gallymin@coopenetlujan.com.ar

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=83754344003>

Victoria Giachino
Universidad Nacional de Luján, Argentina

Elena Craig
Universidad Nacional de Luján, Argentina

RESUMEN:

Actualmente es una necesidad demostrar que los resultados de los laboratorios son confiables. El objetivo es proveer herramientas a utilizar en ensayos de fitopatología que deseen implementar la norma ISO/IEC 17025. En este trabajo se analizaron los requisitos técnicos que implican una interpretación y una adecuación más dificultosa, para implementar un sistema de gestión de calidad en laboratorios que realizan diagnósticos de sanidad forestal. Para alcanzar esta finalidad, se debe demostrar que un método es apropiado mediante equipamiento, insumos y personal calificado. Además, se requiere un trabajo armonizado entre el experto en sistemas de calidad y el fitopatólogo.

PALABRAS CLAVE: Fitopatología, ISO, IEC 17025, calidad.

ABSTRACT:

Currently it is a must demonstrate that the results are reliable laboratories. The goal is to provide tools to use in plant pathology tests wishing to implement ISO/IEC 17025. This paper reviews the technical requirements involving interpretation and adaptation were analyzed more difficult to implement a quality management system in laboratories perform diagnosis of forest health. To achieve this purpose, it must be shown that a method is appropriate with equipment, supplies and qualified personnel. In addition, a harmonized work among the expert in quality systems and plant pathologist is required.

KEYWORDS: Phytopathology, ISO, IEC 17025, quality.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la actividad forestal y el aumento del área cultivada tienen un impacto de importancia en las poblaciones de aquellas especies fitófagas y microorganismos que utilizan diversas especies forestales como recurso alimenticio. Sin embargo, en la Argentina, la sanidad forestal cuenta con pocos laboratorios que aborden la problemática sanitaria integral; entendiendo ésta como el estudio de las plagas de origen animal, vegetal, fitopatógenos y sus enemigos naturales, asociados tanto a especies forestales cultivadas, como a nativas y a especies arbóreas utilizadas en el arbolado urbano.

Actualmente hay una demanda de exponer la seguridad en los productos que se comercializan; por lo que se debe demostrar que los resultados de los laboratorios son confiables. Así pues, la acreditación es un proceso donde los laboratorios deben contratar a una organización independiente y reconocida, para que evalúe y avale la garantía de sus resultados. De esta manera, es una forma de brindar confianza a los clientes, y su costo financiero se justifica cuando el ámbito de acción lo requiera. Además, la norma ISO/IEC 17025 es empleada para la acreditación de laboratorios, en el campo voluntario.

NOTAS DE AUTOR

gallymin@coopenetlujan.com.ar

A su vez, los ensayos de fitopatología presentan cierto grado de dificultad para la implementación de normas de calidad. Esto se debe a que los analistas que trabajan con medios biológicos están manipulando un ser vivo que va experimentando cambios, menores o sustanciales, a medida que pasa el tiempo. Esto ocurre tanto en los materiales analizados como en sus materiales testigos, sea en laboratorio, en invernáculo o en viveros. Debe sumarse el hecho de que tanto los microorganismos como las plantas son seres vivos que interactúan con el ambiente y modifican sus comportamientos (Gally y Rona, 2006).

Por ello, en la definición de enfermedad intervienen cuatro factores: la planta (hospedante), el o los patógeno/s (en enfermedades infecciosas), el ambiente y el tiempo. De allí que, todos estos factores juntos interactúan para que se exprese la enfermedad. De este modo, entendiendo esta definición se comprenden las dificultades de trabajar en esta temática. En este trabajo se mencionan normativas vigentes y también se destaca que no existe bibliografía específica sobre el tema.

En la Argentina el número de laboratorios acreditados en el sector agro-industrial ha crecido en los últimos años, si bien la mayoría tienen relación con alimentos, como es el caso de los laboratorios de residuos de plaguicidas. Se entiende que los laboratorios de diagnóstico fitopatológico están totalmente relacionados, ya que sus resultados conllevan a la decisión de aplicación de productos químicos (Lanfranchi *et al.*, 2008; Gally y Yabar, 2013).

El objetivo es proveer herramientas para facilitar el camino a aquellos laboratorios que deseen implementar la norma ISO/IEC 17025 en ensayos de fitopatología. Se destacan los puntos de importancia referidos a ensayos en la disciplina; desde ya, los mismos pueden adecuarse a otras áreas de la sanidad vegetal.

DESARROLLO DE LA PROPUESTA

Se estudió la norma ISO/IEC 17025, que establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración, abarcando solamente los requisitos técnicos. Para ello, se utilizaron registros de experiencia de auditores del sector, volcada en reuniones de armonización y de los autores en los laboratorios de docencia e investigación de fitopatología y sanidad forestal de la Universidad Nacional de Luján.

También, se analizaron documentos guías emitidos por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA), *Inter American Accreditation Cooperation* (IAAC), la Organización Internacional para la Estandarización (ISO), el Instituto Argentino de Normalización y Certificación (IRAM), *International Laboratory Accreditation Cooperation* (ILAC), y la legislación relacionada con el área forestal que concierne a la disciplina.

Los puntos de la Norma analizados en este trabajo, dentro de requisitos técnicos, son: 5.2. Personal; 5.3. *Instalaciones y condiciones ambientales*; 5.4. *Métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos*; y 5.7. *Muestreo*.

Así pues, sólo se destacarán estos puntos de difícil interpretación y/o implementación, a criterio de los autores y referidos a ensayos en fitopatología para el diagnóstico forestal.

Proceso de acreditación de laboratorios: tanto los términos *acreditación* como *certificación* están referidos al reconocimiento formal, brindado por un organismo competente, a la satisfacción de un conjunto de normas y estándares mínimos previamente establecidos. La denominación acreditación se reserva para instituciones u organizaciones, cuya actividad deviene en un documento testimonial, como por ejemplo, resultados de análisis o ensayos, certificados de aptitud. Por otra parte, los organismos de acreditación desempeñan su tarea con base en criterios internacionales y utilizan métodos de evaluación equivalente y transparente.

Por lo tanto, el proceso de acreditación garantiza que los ensayos evaluados de distintos países realicen sus tareas de manera semejante, generando la adecuada confianza que posibilita la aceptación mutua de resultados. De este modo, las auditorías están basadas no sólo en el sistema de calidad de laboratorio, sino en su competencia técnica. En el caso de los auditores deben ser tan o más competentes que el personal del laboratorio sometido a la auditoría.

En particular, la acreditación en la Argentina, se lleva a cabo a través del Organismo Argentino de Acreditación (OAA), entidad privada sin fines de lucro, creada dentro del marco del Sistema Nacional de Normas, Calidad y Certificación, Decreto 1474/94, a través del comité de Acreditación de Laboratorios de ensayos (www.oaa.org.ar).

Se destaca que, para ensayos biológicos, la norma de aplicación data del año 2005 y está redactada con una terminología más afín a ensayos físicos o químicos. Por consiguiente, se hace más compleja su comprensión para profesionales no formados en gestión de calidad (Gally, 2008).

5.2 Personal: para empezar, una de las principales causas en la discordancia de resultados entre laboratorios en las pruebas comparativas de sanidad se debe a habilidades y experiencia del analista. Antes que nada, el personal que realiza tareas debe ser calificado y su evaluación se realizará a través de: capacitaciones internas y externas, acreditadas; experiencia adquirida; aptitudes. Además, el responsable del sector deberá asegurar la competencia técnica de todo el personal que manipula equipamiento específico, que realiza ensayos, emite resultados; debiendo estar, el mismo, habilitado para cada una de sus responsabilidades.

En el caso particular de fitopatólogos que realizan diagnósticos en vegetales, los ensayos desarrollados, por lo general, en el país son no regulados; ya que, en su mayoría, emiten un diagnóstico para comercio interno. Por lo que, en muchos casos, se aplican métodos propios. Es recomendable que el fitopatólogo trabaje en diagnóstico al menos durante tres ciclos del cultivo, para poder interpretar las expresiones de las sintomatologías en el campo, en distintas condiciones ambientales.

Por otro lado, en el caso de diagnóstico de enfermedades en semillas, el entrenamiento puede ser más corto en cuanto al reconocimiento de patógenos; si el laboratorio cuenta con material herborizado y ceparios. También, es importante que el laboratorio intervenga en los ensayos de aptitud, tanto a nivel nacional como internacional.

Durante su capacitación, es indispensable que el profesional adquiera experiencia en diversos temas, tales como: recolección y acondicionamiento de muestras, observación de sintomatología asociada a diversas patologías, observaciones con instrumental de microscopía, aislamientos de microorganismos fitopatógenos a partir de métodos generales y específicos, detección e identificación y manejo de bibliografía de referencia.

Del mismo modo, si los laboratorios de ensayos incluyen opiniones e interpretaciones de los resultados de los informes, éstas deben ser realizadas exclusivamente por personal con experiencia suficiente y con conocimientos relacionados con el correcto uso de esa información y habilitada para dicha tarea, en concordancia con el método de ensayo utilizado.

5.3 Instalaciones y condiciones ambientales: las instalaciones en las cuales se realizan ensayos biológicos varían, según la naturaleza de los ensayos y las mediciones. A todo esto, los equipos del laboratorio no deben moverse entre las distintas áreas, para evitar una contaminación cruzada accidental; además, normalmente se necesitan áreas separadas o claramente designadas para: la recepción, almacenamiento y acondicionamiento de muestras, para las áreas de siembra y para las áreas de apoyo. Por consiguiente, el área destinada a los ensayos debe estar separada del sector de preparación de medios de cultivo, reactivos, esterilización, descontaminación y lavado de material. De este modo, debe existir un sector donde se recibe y clasifica el material vegetal (semillas, plantas) y otros materiales como sustratos, suelos, etcétera.

Por otra parte, es requisito tener un área destinada al almacenamiento de muestras y contra-muestras, a veces requerida por periodos establecidos, asegurando la integridad de las mismas bajo condiciones específicas con controles de humedad y temperatura, según especificaciones. Para el diseño, los materiales utilizados en las instalaciones y las directrices sobre mantenimiento, calibración y monitoreo de los equipos puede consultarse la *Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos (2002)*, la Norma ISO 7218:2007 y las experiencias del grupo de trabajo en sanidad de semillas.

Asimismo, se debe disponer de una cabina de bioseguridad, de una clase acorde con el nivel de riesgo de los microorganismos que se manipulen cuando se manejen patógenos y/o cultivos; la misma deberá estar en el sector de ensayos.

5.4 Métodos de ensayo, de calibración y validación de los métodos: los métodos de rutina que se emplean en el laboratorio deben ser claros y deben contener el detalle de los puntos críticos de la operación, para que puedan ser fácilmente interpretados por los analistas, sin cometer errores. Así pues, suele ser de utilidad volcar los mismos en un diagrama de flujo.

Los materiales biológicos que se emplean en los ensayos como materiales de referencia deben ser certificados; tal como lo detalla Mastromónaco (2015), refiriéndose a los criterios que deben cumplir las colecciones de cultivos reconocidos, sean nacionales o internacionales. Además, se debe tener en cuenta que se deben manipular adecuadamente, ya que pueden perder sus características específicas en los distintos repiques.

En lo referente al proceso de los ensayos, es recomendable la utilización de métodos normalizados o de referencia en sus últimas versiones. Sin embargo, el laboratorio no está obligado a utilizarlos si dispone de un método propio con el que obtenga resultados equivalentes o superiores. En estos casos, se debe presentar una validación adecuada que debe realizar el laboratorio y que debe ser aceptada por el organismo de acreditación del país (Villock-Cambas, 2009).

Para la validación de los métodos de ensayo, se recomienda —para un laboratorio que comienza a implementar normas de gestión— elegir aquellos ensayos que ya poseen normativas reconocidas; debido a que la validación es una tarea ardua, que además lleva insumos y personal dedicado a la misma. Por cierto, la validación consiste en documentar el método utilizado, ensayado en condiciones claramente preestablecidas y demostrar que cumple adecuadamente con la determinación de los parámetros para los que fue diseñado (Steiner et al., 2008).

Por otra parte, para decidir si un método es apropiado o no, se debe tener en cuenta: si es aplicable al patógeno a analizar, la cantidad de muestra necesaria para el ensayo, el equipo utilizado y si el uso de esa metodología es acorde con las exigencias requeridas en el país.

A todo esto, para comenzar a interpretar en qué casos es necesario validar un método se definirán los siguientes términos, basados en los criterios del OAA (www.oaa.org.ar)

- *Método normalizado*: se trata de un procedimiento de ensayos estandarizado y normalizado, que se aplica exactamente como está descrito en la norma. En este caso, el laboratorio debe hacer una confirmación de que los aplica correctamente; es lo que se denomina “verificación”. O sea, comprobar que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.

- *Modificación de un método normalizado*: métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, o bien, aquellos métodos que se han reformado en uno o más puntos del proceso. Se trata de una modificación a un procedimiento de ensayo normalizado, por ejemplo: un método de extracción diferente, distinta matriz, otro equipo, etcétera. El objetivo de validación, en este caso, es la comprobación de que la repetitividad, la reproductibilidad, la precisión intermedia y la exactitud del método original no dependen de la modificación introducida y que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente.

- *Métodos propios*: se trata de un procedimiento de ensayo interno (propio) elaborado en el laboratorio y que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos; en este caso, el proceso de validación es mucho más arduo, ya que se debe demostrar que cada paso elegido responde a lo esperado. De este modo, el objetivo es la comprobación de que el método tiene repetitividad, la reproductibilidad, la precisión intermedia y exactitud suficiente para el objetivo de la aplicación y, además, que el laboratorio domina el ensayo y lo realiza adecuadamente.

El alcance de la validación y los parámetros estadísticos, en caso necesario, deben asentarse por escrito en forma de informe de validación. Aparte, para la validación/verificación de los métodos de ensayo, debe tenerse en cuenta que es necesario reflejar las condiciones reales de ensayo. Esto puede conseguirse utilizando muestras naturales, preferentemente, a efecto de considerar la existencia de una microflora acompañante, según la naturaleza del sustrato que se estudie.

A todo esto, en ensayos de sanidad vegetal los ensayos pueden arrojar resultados de tipo: cuantitativos, cualitativos o de diagnóstico. En la disciplina, la mayoría de los resultados son cualitativos o de diagnóstico; en estos casos, se recomienda aplicar los conceptos establecidos por el ILAC (2016). Por tanto, debe tenerse criterio técnico y decidir para cada ensayo cuáles parámetros validar para que dicho proceso tenga un sentido lógico. Así pues, la experiencia del experto debe determinar cuál de ellos es conveniente emplear y cómo hacerlo, según se trate de los distintos tipos mencionados y elegir el tipo de muestra adecuada.

Para todos los ensayos, ya sean cualitativos o cuantitativos, el laboratorio debe identificar las fuentes de variabilidad (componentes de incertidumbre) y demostrar cómo se les controla. De este modo, la identificación de las mismas puede realizarse utilizando algunas herramientas de la calidad, tales como: diagramas de flujo, diagramas espina de pescado, tablas, listas, etcétera. Así, al aplicar la metodología se valida la *performance* del método y se estima la inexactitud del resultado dentro de un nivel de confianza

5.7 Muestreo: la toma de muestras es un trabajo complejo que requiere: conocimiento, habilidad, comprensión tanto del problema como de la patología asociada. De este modo, los puntos a considerar en el muestreo son: •

- Elegir cuidadosamente la muestra a analizar; la cual debe estar basada en métodos estadísticos apropiados, si se trata de un ensayo y/o un trabajo de investigación; u obtener muestras representativas, si se trata de un lote productivo (comercial); en este último caso, los resultados emitidos son referidos únicamente a las muestras recibidas, lo cual no ampara la totalidad del lote; esta condición debe quedar aclarada en el informe de resultados.

- Durante las extracciones de las muestras, tomar las mayores precauciones de asepsia.

- Identificar correctamente las muestras (rotular).

- Proteger la muestra de las condiciones ambientales que puedan causar algún cambio en sus características originales.

- La muestra deberá ir acompañada con una planilla donde figuren datos relevantes, como: fecha de muestreo, nombre de quien tomó las muestras, datos del cultivo (especie, edad, etcétera), síntomas y signos observados, distribución de los síntomas en el lote, datos de manejo del cultivo (silvicultura: riego, fertilización, agroquímicos utilizados, etcétera).

- El transporte y conservación de las muestras deben hacerse en condiciones apropiadas para mantener su integridad (por ejemplo: refrigeradas o congeladas, según sea necesario). Dichas condiciones deben ser controladas, manteniendo un registro de las mismas.

- El laboratorio debe documentar el procedimiento, para tomar la porción analítica a partir de las muestras recibidas e implementar medidas para asegurar que la misma sea lo suficientemente representativa de la muestra original; y que su composición no se altere de manera que afecte la concentración o identificación de los microorganismos a ser determinados.

- Es recomendable que el laboratorio facilite un instructivo para la toma de muestras si no es el responsable directo de la extracción.

- En todos los casos, el muestreo debe ser realizado exclusivamente por personal debidamente calificado.

En el laboratorio, al recibir las muestras, también es importante tener en cuenta:

- Registrar fecha y hora de llegada de las muestras, y del personal que las recibió.

- Naturaleza y características de la muestra, cantidad y estado en el momento de su entrega.

- Recibir y verificar la planilla de la muestra rotulada y con los datos de campo.

- Las muestras que se encuentren a la espera de ser analizadas deben almacenarse en condiciones adecuadas para reducir al mínimo cualquier modificación.

CONCLUSIONES

De este modo, el objetivo de un laboratorio de sanidad forestal consiste en demostrar la competencia técnica, es decir, poseer confianza en los resultados. Pues bien, para cumplir con dicho objetivo, una herramienta de gran utilidad es obtener la acreditación de sus ensayos. La norma IRAM 301 (equivalente a ISO/IEC 17025:2005): requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y de calibración, es la norma empleada para acreditar ensayos a través del ente de acreditación correspondiente; y asegurar, de este modo, la competencia técnica del laboratorio.

Un ejemplo concreto de este trabajo conjunto en la Argentina fue la acreditación de dos ensayos fitopatológicos por el (*Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria* SENASA) ante el OAA; los cuales permitieron demostrar la exportación de cítricos libres de cancrisis (*Xanthomonas citri subsp. citri*) y mancha negra (*Guignardia citricarpa*) a la Unión Europea, y también en el laboratorio de sanidad vegetal de la Estación Experimental INTA Bella Vista, en la provincia de Corrientes.

Al ser analizados los puntos de la norma citada, se encontró que los referidos a gestión, se pueden aplicar directamente, siempre que el personal del laboratorio haya recibido previamente cursos de calidad.

En el caso de los requisitos técnicos presentan, a veces, un diverso grado de dificultad para su implementación, por lo que se requiere de un trabajo conjunto entre el experto en sistemas de calidad y el fitopatólogo.

Por lo tanto, la capacitación del personal, el uso apropiado de equipos y el manejo del concepto de incertidumbre en la medición, se consideran puntos críticos que contribuyen al aseguramiento de la calidad de los resultados.

Es oportuno agregar que, además de la norma de referencia, hay que tener en cuenta que pueden existir otros requisitos específicos y legales en cada país, para cada ensayo según su naturaleza, fijada por la autoridad regulatoria; o bien, los indicados por las buenas prácticas en ese sector.

A modo de ejemplo, se cita la aplicación de normativas internacionales NIMF 15, que son hoy un decreto obligatorio en Argentina (SENASA, 2012).

LITERATURA CITADA

- ENAC 04:2002. (2002). Guía para la Acreditación de Laboratorios que realizan Análisis Microbiológicos. <http://cidta.usal.es/cursos/calidad/modulos/documentos/lab/> (Consultada el 08 de marzo de 2016).
- Gally, T. (2008). Mejoramiento de la calidad de los resultados en laboratorios de patología vegetal. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 26 (01):79-82.
- Gally, T. y Rona, N. (2006). Sistemas de calidad para aplicar a ensayos de sanidad de semillas. *Seed News* (2):20-22.
- Gally, T. y Yabar, M. (2013). *Ensayos de fitopatología desafíos para su acreditación*. Memorias XXXVIII Jornadas IRAM-Universidad y el XXV Foro UNILAB, Santiago del Estero, Argentina. 39 pp.
- ILAC. (2016) International laboratory accreditation cooperation. <http://www.ilac.org>. (Consultada el 08 de marzo de 2016).
- ISO 7218. (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations*. 72 pp.
- ISO 17025. (2005). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y calibración*. 35 pp.
- Lanfranchi, R.; Manna, M.; Gómez, M.; Sugía, V.; Ravinale, C. y Antenucci, M. (2008). Acreditación del ensayo "Detección de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*". Memorias 1º Congreso Argentino de Fitopatología. 361 pp.
- Mastromónaco, G. M. (2015). *Criterios para asegurar la trazabilidad y calidad de cultivos microbianos de referencia*. Tesis de maestría en Calidad Industrial. Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina.
- OAA. (2016) Organismo Argentino de Acreditación. <http://www.oaa.org.ar> (Consultada el 8 de diciembre de 2015).

- Steiner, A. M.; Kruse, M. y Leist, N. (2008). Method validation a historical retrospect. Interantional Seed Testing Association (ISTA).
- SENASA. (2012). Normas internacionales para medidas fitosanitarias NIMF No. 15 Directrices para reglamentar el embalaje de madera utilizado en el comercio internacional. <http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/12/nimf-15.pdf> (Consultada el 08 de junio de 2016).
- Villoch-Cambas, A. M. (2009). Acercamiento a la Acreditación y a las Buenas Prácticas de Laboratorios (BPL) dirigidas a laboratorios de ensayos de microbiología y biotecnología. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria San José de la Lajas, La Habana, Cuba. <http://es.scribd.com/doc/58473783/acreditaciony-bpl> (Consultada el 08 de marzo de 2016).