

**NORMAS DE FUNCIONAMIENTO DE LABORATORIOS DE ANÁLISIS**  
**FITOSANITARIOS DE PAPA SEMILLA**

**DISPOSICIONES GENERALES**

**GENERALIDADES**

El alcance de la presente normativa es referente a los diagnósticos obligatorios de enfermedades y nematodos transmitidos a las distintas categorías y subcategorías de papa semilla.

Los laboratorios deberán contar con las condiciones ambientales, físicas y de equipamiento necesarias para el desarrollo de sus tareas, y podrán realizar sólo los ensayos para los cuales el INSTITUTO NACIONAL DE SEMILLAS (INASE) los haya habilitado.

Dichos ensayos deberán estar documentados en protocolos con sus respectivos documentos de adopción del método. Tal como se menciona en el Anexo II, estos documentos deberán ser presentados ante la Dirección de Evaluación de Calidad para su aprobación. Cualquier modificación posterior implicará la necesidad de un nuevo protocolo con su respectivo documento de adopción del método.

Asimismo, se recomienda que se tengan en cuenta las normas de higiene y seguridad y aquellas referidas al descarte seguro de residuos del laboratorio.

El Director Técnico deberá capacitar a los analistas dejando la debida constancia de dicha capacitación en el legajo del personal.

**INSTALACIONES**

El área del laboratorio y cada una de sus dependencias deben ser compatibles con el volumen de muestras que se procesen y con el personal disponible. Se debe establecer una separación eficaz entre zonas vecinas cuando se desarrollen en ellas actividades incompatibles de forma que el acceso y el uso de todos los sectores sea definido y controlado. Estos sectores estarán detallados en un croquis en escala que deberá presentarse al momento de la solicitud de habilitación.

En función del o los análisis para los cuales el laboratorio desee estar habilitado se deberá disponer de:

- Sector de recepción e ingreso de muestras (independiente de los demás sectores).
- Sector de acondicionamiento y lavado de muestras.
- Sector de brotación, el cual debe contar con temperatura y humedad adecuadas, con suficiente espacio para almacenar y acondicionar las muestras a analizar.
- Sector para el análisis de virus.
- Sector para el análisis de nematodos.
- Sector para análisis físico, morfológico y fisiológico.
- Sector para almacenamiento de drogas y reactivos.
- Sector para almacenamiento de materiales de vidrio y plástico.
- Sector para el lavado de material.
- Sector de archivo de muestras.
- Sector de oficina.

### **EQUIPAMIENTO**

El laboratorio deberá estar provisto de todos los insumos y equipos necesarios para la correcta ejecución de los ensayos para los cuales el laboratorio desee habilitarse. Cada equipo tendrá una ficha técnica que contenga toda la información necesaria del mismo, así como las reparaciones, mantenimientos y calibraciones realizadas. Todos los equipos deberán ser mantenidos en adecuado estado de funcionamiento, debiendo para ello elaborarse un plan de mantenimiento/verificación de los mismos.

### **MATERIALES DE REFERENCIA**

El laboratorio deberá contar con el material de referencia (controles/testigos positivos y sanos) adecuado para conducir los ensayos, el cual será identificado con las características técnicas que se consideren relevantes.

### **PROCEDIMIENTOS, REGISTROS Y DOCUMENTOS**

El laboratorio deberá mantener un sistema documental en el que consten los siguientes registros:

- Protocolo de brotación y documento de adopción del método.
- Protocolo de análisis virológico y documento de adopción del método.
- Registro de pruebas periódicas de dilución de anticuerpos utilizados.
- Protocolo de análisis nematológico y documento de adopción del método.
- Registro de ingreso de muestras.
- Registro de brotación.
- Registro de análisis de virus (incluye boletín interno de análisis y lecturas del lector de microplacas).
- Registro de análisis de nematodos (boletín interno de análisis).
- Certificados de análisis emitidos.
- Registro de reactivos (facturas y/o remitos, fichas informativas que acompañan a los reactivos).
- Registro de equipos (listado de equipos, plan de mantenimiento, registros de controles, fichas técnicas).
- Registro de materiales de referencia.

**Registro de ingreso de muestras:** se registrarán en él todas las muestras que ingresen al laboratorio, se haya emitido certificado o no, con número correlativo (muestras de control interno de calidad, particulares, entrenamiento, test de referencia, muestras de fiscalización y otras). Los campos mínimos obligatorios que debe contener este registro y que deben ser completados son: número de muestra, código, peso del lote, fecha de recepción, remitente, procedencia u origen, especie, estado de la muestra, número de tubérculos enviados, fecha de inicio y final del análisis, fecha de emisión del certificado de análisis.

**Registro de análisis (de virus y nematodos):** se elaborará un registro de análisis por cada muestra el cual deberá estar identificado con el mismo número de entrada que posee la muestra en el registro de ingreso de muestras.

El registro de análisis deberá contar con la siguiente información: número de ingreso de la muestra, determinaciones solicitadas, fecha de inicio y finalización del análisis, resultados obtenidos, metodología utilizada, datos e identificación del analista (si las etapas fueran desarrolladas por distintos analistas, cada uno deberá indicar la etapa que le corresponda mediante firma y aclaración o sus iniciales). Se recomienda dejar un espacio para anotar observaciones que hubiera del ensayo.

**Informe de los resultados:** los resultados de los ensayos solicitados se informarán en el "Certificado de Sanidad de Papa Semilla" (Anexo IV).

Los resultados de virus y nematodos se informarán con una sola cifra decimal (cuando el centésimo sea igual o superior a CINCO (5), el décimo informado será el inmediato superior; si el centésimo es inferior a CINCO (5), el décimo será el obtenido en el cálculo). Para el informe de mosaico rugoso (PVX + PVY) se sumarán aquellos pocillos en los que ambas determinaciones resultaron positivas en la determinación individual de las mismas.

Los análisis físicos, morfológicos y fisiológicos se informarán en el Certificado en el punto "Otros Ensayos".

### **Archivo de Registros y Documentos:**

Todos los registros, documentos y certificados emitidos deberán guardarse por un plazo de CINCO (5) años.

### **MUESTRAS PARA ANÁLISIS**

Las muestras recibidas deben ser identificadas con su respectivo número de ingreso.

Se deberán procesar como mínimo OCHENTA Y CINCO (85) de cada CIEN (100) tubérculos ingresados.

Una vez que ingresan al laboratorio deben procesarse en el menor tiempo posible. En caso de no poder analizar las muestras inmediatamente, deberán conservarse en lugar seco y ventilado para evitar alteraciones en la calidad de las mismas.

La temperatura de conservación de las muestras no debe ser mayor a 15 °C y se deberán desechar los tubérculos que lleguen en mal estado.

Las muestras quedarán a total disposición del INASE, durante VEINTE (20) días corridos después de entregado el correspondiente Certificado de Análisis, lapso durante el cual deberán mantenerse en condiciones adecuadas de temperatura y humedad y protegidas de contaminaciones. Se deberá garantizar la presencia de por lo menos el brote apical.

### **ANÁLISIS FÍSICO, MORFOLÓGICO Y FISIOLÓGICO**

La muestra a analizar se deberá lavar previamente y luego se someterá al análisis de síntomas visuales determinando los defectos externos según la tabla de "Tolerancias de Anormalidades de la normativa vigente".

### **ANÁLISIS VIROLÓGICOS**

#### **Equipamiento**

- Micropipetas de volúmenes variables o varias de volúmenes fijos.
- Peachímetro rango de pH de 0 a 14, resolución 0,01, error +/- 0,1.
- Estufa de cultivo de temperatura regulable.
- Sistema de extracción de jugo de las muestras: mecánico (extractor / dispensador de jugo de papa) o manual con bolsas de plástico.
- Balanzas analíticas, capacidad para pesar 120 gr., precisión 0,001 gr.
- Heladera y Freezer (-20 °C).
- Equipo para producción de agua destilada o similar (o en su defecto deberá contar con agua destilada).
- Lector de microplacas (espectrofotómetro 405 nm).

#### **Reactivos**

Los distintos reactivos empleados en los análisis de rutina deberán estar rotulados con: fecha de apertura del envase y fecha de vencimiento. Si se trata de soluciones preparadas en el laboratorio (como buffers), el rótulo deberá tener los siguientes datos: nombre de la solución, fecha de preparación, fecha de vencimiento, pH y nombre del analista que preparó la misma.

#### **Material de Referencia**

Tal como se mencionó anteriormente, el laboratorio deberá contar con los testigos positivos y sanos adecuados para conducir los ensayos. Asimismo, deberá tener en cuenta que la intensidad de la reacción puede cambiar según la variedad. Por lo tanto, se recomienda tener testigos positivos y sanos acordes a la variedad de la muestra a analizar al momento de la adopción del método.

#### **Tratamiento de brotado de papa**

Los tubérculos de papa debidamente identificados serán sometidos a un proceso para promover la brotación según el protocolo que utilice el laboratorio. Este protocolo deberá estar avalado por el documento de adopción del método (ver Anexo II).

En el registro de brotación se deberá indicar: la fecha de inicio del proceso, control de temperatura en el recinto, fecha de finalización del proceso y porcentaje de tubérculos brotados.

No podrá realizarse el análisis virológico hasta que transcurran TRES (3) semanas desde el inicio de la ruptura de dormición. Para realizar los análisis es necesario que los tubérculos estén uniformemente brotados. Se deberá utilizar UN (1) brote de cada tubérculo procesado.

### **Técnica ELISA**

El protocolo empleado dependerá de la marca comercial del kit utilizado por el laboratorio, debiendo el mismo estar documentado y adoptado. Se deberán tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- La extracción se realizará a partir de brotes, hojas o tubérculos brotados según el protocolo empleado por el laboratorio, con una dilución previamente determinada (habitualmente se utilizan VEINTE (20) ml de solución de extracción por cada gramo de tejido vegetal).
- La prueba de diluciones de anticuerpos se realizará cada vez que se abre un nuevo lote de anticuerpos y deberá emplearse un positivo de baja concentración.
- Se deberá emplear el brote apical para los análisis. Para el caso del PLRV, cuanto más cerca se esté de la cosecha, se deberá emplear brotes de la zona del ombligo.
- Sólo se permitirá el uso de anticuerpos policlonales.
- El número de testigos a emplear por placa, será como mínimo, el siguiente:
  - testigos positivos (enfermos): DOS (2). Uno de la menor concentración posible tal que se distinga del testigo sano y otro de una concentración mayor.
  - testigos negativos (sanos): TRES (3).
  - blanco (buffer): UNO (1).
- El agregado de azida sódica a los buffers permite su conservación durante DOS (2) meses. En caso contrario, se deberán usar dentro de las VEINTICUATRO (24) horas.

El uso de leche descremada permite eliminar riesgos de reacciones inespecíficas. Su uso en el buffer conjugado es particularmente útil para PLRV.

- La lectura de la placa debe realizarse únicamente utilizando el lector de microplacas. El informe de resultados deberá efectuarse basándose en la información obtenida del lector de microplacas.

### **Interpretación de resultados**

El tiempo de lectura variará según la calidad de las placas empleadas, del virus analizado y de los anticuerpos empleados. Se podrá hacer una lectura preliminar a los TREINTA (30) minutos y la lectura final deberá ser a los SESENTA (60) minutos. Se considerarán muestras positivas a aquellas cuyas lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm (A405) sean superiores a la media de los TRES (3) testigos sanos más TRES (3) veces el desvío estándar. Todas las muestras con valores de absorbancia menores a lo expresado serán consideradas sanas.

En caso de lecturas donde el cálculo arroje interpretaciones dudosas o confusas, la interpretación final de los resultados quedará a criterio del Director Técnico.

## **ANÁLISIS NEMATOLÓGICO**

### **Equipamiento**

- Microscopio óptico (35X a 100X).
- Centrífuga (dependiendo del método empleado).
- Licuadora eléctrica.
- Tamices de distintas tramas.
- Balanza analítica.

### **Determinación de *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne* spp.**

La muestra deberá dividirse en grupos de no más de VEINTE (20) papas. Se deberá pelar sólo la mitad de cada papa. Si en alguno de estos grupos se encontrara más de un individuo, se deberá volver a la muestra y analizar papa por papa (que conserva una mitad sin pelar) ya que los resultados de *Nacobbus aberrans* y de *Meloidogyne* spp. deben expresarse en porcentaje.

### Procedimiento

Una vez ingresada la muestra de tubérculos, se realizará una inspección visual para separar los tubérculos con síntomas visibles, los dudosos y los aparentemente sanos, colocándolos en canastos aireados. Eliminar la tierra y restos orgánicos de los tubérculos dejando la superficie limpia de todo elemento extraño. Se podrá realizar la observación del material dilacerando bajo microscopio óptico tejidos con síntomas visibles de agallas o presencia de zonas necróticas.

Se procederá al pelado de los tubérculos (DOS (2) mm de profundidad), empleando un utensilio filoso para una mejor extracción de la epidermis.

Se pesarán entre VEINTE (20) a CUARENTA (40) gramos de las pelas y se licuarán, incorporando DOSCIENTOS (200) ml de agua y DOS (2) o TRES (3) gotas de detergente (DIEZ (10) a NOVENTA (90) segundos, según sea la velocidad del aparato).

Se trasvasará y decantará durante TRES (3) minutos (o se dejará decantar en la licuadora), eliminando el sobrenadante.

Se procederá luego a tamizar el material, empleando un colador y una batería de tamices de malla N°: 60, 270, 300 y 325, descartando el material del colador y el del tamiz de malla N° 60.

Se trasvasará el contenido del último tamiz (de malla N° 325) con una fina lluvia de agua a un vaso de precipitado. Luego se procederá a la evaluación, pudiendo utilizarse el método de evaluación directa o indirecta según se requiera.

**Evaluación directa:** se colocará el material en una caja de Petri, procurando observar cada vez DOS (2) a TRES (3) cm<sup>3</sup> de suspensión, volumen suficiente para cubrir con una delgada capa el fondo de la misma. Este pequeño volumen facilitará una mejor transparencia de la suspensión para la observación y recuento de los nematodos extraídos bajo microscopio óptico.

También es posible la coloración del material y su posterior observación directa bajo microscopio óptico.

**Evaluación indirecta:** se centrifugará el material transfiriendo el contenido del vaso de precipitado al interior de los tubos de la centrífuga, siendo conveniente el agregado de DIEZ (10) gr. de kaolín, a fin de favorecer la sedimentación de los elementos más pesados que el agua (nematodos y fase mineral). La duración de este centrifugado

### **ANEXO III**

será de CUATRO (4) minutos a 3000 rpm. El sobrenadante obtenido (materia orgánica y agua) será desechado.

Al sedimento resultante de la primera centrifugación se le agregará una cierta cantidad, que varía en función de la capacidad de los tubos de centrífuga empleada, de solución azucarada de densidad 1,18 (60%). El sedimento es totalmente disgregado con ayuda de un agitador a fin de lograr una buena suspensión del primero en la solución azucarada. Se realizará una segunda centrifugación con el objeto de obtener una solución límpida en la cual sea fácil observar los nematodos. Se realizará un centrifugado de UN (1) minuto a 1800 rpm. Los nematodos quedarán en suspensión en el sobrenadante. Rápidamente se pasará el sobrenadante por el tamiz de malla Nº 325 y se transferirán los nematodos a una caja de Petri u otro recipiente con ayuda de una fina lluvia de agua. Esta operación deberá ser rápida para evitar que los nematodos se plasmolicen. La solución resultante será límpida y los nematodos podrán ser observados bajo microscopio óptico.



República Argentina - Poder Ejecutivo Nacional  
1983/2023 - 40 AÑOS DE DEMOCRACIA

**Hoja Adicional de Firmas**  
**Anexo**

**Número:**

**Referencia:** Anexo III EX-2022-114895355-APN-DA#INASE

---

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 9 pagina/s.