

REGIÓN : _____

PAUTA N°: _____

FECHA : _____

PAUTA DE INSPECCIÓN DE LABORATORIOS DE ANÁLISIS DE TOXINAS MARINAS

La presente pauta es aplicable a la inspección de todos aquellos laboratorios de análisis de biotoxinas marinas, que participan de los programas de Sernapesca.

Entidad de Análisis: _____

Inspector Sernapesca: _____

Acompañantes durante la Inspección _____

SEGUIMIENTO Y LEVANTAMIENTO DE NO CONFORMIDADES (NC) DE INSPECCIÓN ANTERIOR (M.06.11.20)

N° Pauta anterior:

N°	DESCRIPCIÓN DE NO CONFORMIDAD (NC)	ACCIONES Y MEDIDAS CORRECTIVAS	PLAZO CUMPLIMIENTO	CUMPLE? (SI/NO)	OBSERVACIONES

SERNAPESCA

Inspección actual:

RECEPCIÓN DE MUESTRAS

Cod	Puntos de Control	Si/No	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
1	Recepción de Muestras		
1.1	Al recibir muestras frescas o congeladas estas son refrigeradas o congeladas hasta su proceso.		

ASPECTOS GENERALES

Cod	Puntos de Control	Si/No	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
2	Aspectos generales		
2.1	El peachímetro tiene una precisión de 0.1 unidades de pH.		
2.2	El peachímetro se verifica diariamente, o con cada uso.		
2.3	Se utilizan al menos 2 soluciones estándar (pH 2 y 7) para calibrar el peachímetro. Las soluciones se utilizan sólo una vez.		
2.4	Verificar diariamente o en cada uso que el equipo cumpla con el "slop" dado por el fabricante. El valor de la pendiente se anota en el registro.		
2.5	La balanza cuenta con una sensibilidad de al menos 0.1 g para pesos de 150 g.		
2.6	Las balanzas se verifican semanalmente con las masas patrón calibradas.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Si/No	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
2.7	La temperatura del refrigerador se monitorea diariamente con termómetro de inmersión. La temperatura se mantiene entre 0 y 4°C. Es debidamente registrada.		
2.8	La temperatura del congelador se monitorea diariamente y se mantiene a -20°C o menos. Es debidamente registrada.		
2.9	Se verifica residuos de detergentes a todos los lotes de material lavado. La prueba se realiza con solución de azul de bromotimol 0.04%. Los resultados son debidamente registrados.		
2.10	El agua para soluciones es destilada o desionizada y su calidad es determinada a partir de la conductividad (La clase 1 mide hasta 2uS/cm a 25°C y clase 2 5 uS/cm a 25°C (NCh 426/2)).		
2.11	En el agua para soluciones se analiza la presencia de metales pesados Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn (< 0.5 mg/l) anualmente, con un contenido total de metales pesados ≤ 1.0 mg/l. Es debidamente registrado.		
2.12	En el agua para soluciones se analiza la presencia de heterótrofos < 1000 CFU/ml mensualmente. Es debidamente registrado.		

PREPARACIÓN DE ÍTEM DE ENSAYO

Cod	Puntos de Control	Si/No	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
3	Preparación de la muestra		
	VPM, VAM		
3.1	Se usa mínimo 12 unidades y 200 g de carne por cada toxina.		
3.2	De no cumplirse lo anterior, el laboratorio tiene implementado un protocolo para especies de moluscos no típicos.		
3.3	La limpieza es con agua fresca, exhaustiva y asegura la remoción de arena u otro material.		
3.4	3.4.1. En moluscos bivalvos, se remueve todo el tejido.		
	3.4.2. En gasterópodos, locos y abalones se remueve todo el tejido.		
3.5	La carne es drenada en tamiz. Piezas de concha y el drenado es descartado.		
3.6	La carne drenada es homogenizada a alta velocidad.		

SERNAPESCA

3.7	En conservas se homogeneiza todo el contenido, incluido líquido de cobertura. Si el tarro es grande se separa tejido del líquido, se pesan ambas fases, se muele tejido, se recombina proporcionalmente y se homogeneiza.		
	VDM		
3.8	Tratamiento de muestra es como en 3.1 a 3.7, con la excepción que se deben obtener 25 gramos de hepatopáncreas, el que es drenado como en 3.6.		
3.9	La carne se procesa completa para:		
	3.9.1. Moluscos bivalvos de hepatopáncreas pequeño o moluscos que no tienen hepatopáncreas.		
	3.9.2. Tunicados, equinodermos, gasterópodos.		
	3.9.3. Para muestras en conserva se drena completo en tamiz, se descarta líquido, se lava con agua destilada y se vuelve a drenar.		
	3.9.4 En aceite y salsa oleaginosa, se descartan todos los ingredientes, se lava con agua destilada, luego se separa hepatopáncreas o se homogeneiza todo según el tipo de producto.		

ANÁLISIS DE TOXINA PARALIZANTE.

Cod	Puntos de Control	Si/No	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
4	Preparación y almacenamiento de reactivos y solución de referencia		
4.1	La solución estándar de referencia (100 µg/ml) de VPM una vez abierta no puede ser almacenada.		
4.2	La solución de trabajo (1 µg/ml) de VPM y sus diluciones se preparan con HCl pH 3, en material de vidrio clase A, o bien gravimétricamente.		
4.3	La solución de trabajo de VPM (1 µg/ml) es almacenada por máximo 6 meses y es verificada gravimétricamente por pérdidas por evaporación. Es debidamente registrado.		
4.4	Las diluciones de solución de trabajo (1 µg/ml) de VPM son descartadas luego de su uso.		
5	Extracción		
5.1	Se pesan 100 gramos de la muestra homogenizada y se agrega igual cantidad en volumen de HCl 0.1N ó 0.18N.		
5.2	El pH se ajusta entre 2.0 y 4.0, con HCl 5N o NaOH 0.1N con peachímetro. El pH es debidamente registrado.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Si/No	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
5.3	El homogenizado es rápidamente llevado a ebullición por 5 min. y es enfriado		
5.4	Se repite 5.2.		
5.5	El volumen del extracto (o masa) se ajusta a 200 ml (o g) con HCl 0.003 N hasta pH 3.		
5.6	El extracto es llevado a un vaso precipitado, es homogenizado y luego decantado. De ser necesario, el sobrenadante es centrifugado.		
5.7	Si los ratones no pueden ser inyectados inmediatamente, el sobrenadante es refrigerado hasta 24 horas. Alcanzan temperatura ambiente antes de ser inyectados.		
6	Bioensayo		
6.1	Se utiliza jeringas de 26 gauge para la inyección		
6.2	Peso de ratones esta en el rango de 17 a 23 gramos (preferible 19 a 21 gramos). Se pesan con una precisión de 0.5 gramos o menos.		
6.3	Ratones son aclimatados antes del ensayo dependiendo de la procedencia.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Si/No	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
6.4	El factor de conversión (FC) se verifica utilizando 5 ratones: _____ Semanalmente (si ensayos son realizados varias veces en una semana) _____ Cada vez que se realiza un ensayo (si se realiza menos de un ensayo por semana) _____ Otra frecuencia: _____		
6.5	Si FC falla (cae fuera del rango de $\pm 20\%$), se vuelve a calcular utilizando 2 grupos de 10 ratones. Si nuevamente falla, se investiga causa y se corrige. Esto es debidamente registrado.		
6.6	Si el FC falla (cae fuera del rango de $\pm 20\%$), más de 3 veces en el año, bioensayo se debe volver a estandarizar.		
6.7	Se utilizan 3 ratones para cada análisis.		
6.8	Ratones son observados por 20 min luego de inyección. Y revisados periódicamente por una hora.		
6.9	Tiempo de muerte es registrado con precisión, en último aliento del ratón.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Si/No	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
6.10	Si la mediana del tiempo de muerte es < 5 min se diluye con HCl 0.003N hasta pH 3 para obtener un tiempo de muerte entre 5 y 7 min.		
7	Cálculo de Toxicidad		
7.1	Tiempo de muerte es convertido a unidades ratón (UR para el tiempo) en tabla de Sommer (Tabla 6 del Recommended Procedures 4ª Ed.).		
7.2	En ratones sobrevivientes tiempo de muerte es > 60 minutos, equivalente a 0.875 UR.		
7.3	Peso de ratón se corrige a UR para el peso en tabla de Sommer (Tabla 7 del Recommended Procedures 4ª Ed.).		
7.4	La Unidad de Ratón Corregida (URC) se obtiene mediante: $URC = URTIEMPO \times URPESO$ Se selecciona la mediana de los URC obtenidos de cada ratón.		
7.5	La concentración de toxina se obtiene mediante: $CTOXINA = URC \text{ (mediana)} \times FC \times \text{Factor de dilución} \times 200$		
7.6	Para el PSMB, los resultados son informados dentro del período establecido por Sernapesca y se respetan los plazos de informar.		

ANÁLISIS DE TOXINAS LIPOFÍLICAS (DIARREICAS).

Cod	Puntos de Control	Calif.	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
8	Extracción en hepatopáncreas		
8.1	Homogenización es en licuadora o Ultra-Turrax por 2 minutos y relación gramos hepatopáncreas respecto a volumen acetona es 1:5.		
8.2	Homogenizado es: _____ Filtrado al vacío. _____ Filtrado por gravedad		
8.3	Filtrado o sobrenadante se evapora en rotavapor hasta sequedad a 42 ± 2 °C. La temperatura es debidamente registrada.		
8.4	Finalizada la evaporación, se transfiere a un recipiente adecuado 25 ml de agua desionizada y 25 ml de dietileter (DEE) o diclorometano (DCM). Se descarta la fase acuosa. (repetir este proceso 3 veces). (Extracción líquido-líquido)		
8.5	Se transfiere fase orgánica a nuevo embudo de decantación realizando nueva extracción líquido-líquido, en dos etapas, agregando y descartando fase acuosa (5 ml) en dos etapas.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Calif.	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
8.6	Fase orgánica es evaporada en rotavapor hasta sequedad u obtener residuo oleoso, a misma temperatura que 8.3. La temperatura es debidamente registrada.		
8.7	Residuo es resuspendido en 4 ml de Tween 60 al 1%.		
9	Extracción en cuerpo entero de marisco.		
9.1	Se lleva a cabo según 8.1 a 8.7, pero extracción con acetona es en dos etapas, una con relación gramos marisco a volumen de acetona 1:3 y la otra 1:2.		
10	Bioensayo		
10.1	Se utiliza jeringas de 22 - 26 gauges.		
10.2	Peso de ratones entre 19 y 21 gramos.		
10.3	Se inocula 1 ml de solución obtenida en 8.7.		
10.4	Ratones son aclimatados antes del ensayo dependiendo de la procedencia.		
10.5	Se utilizan 3 ratones.		
10.6	Se observan por 24 horas.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Calif.	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
10.7	Interpretación de resultados:		
	10.7.1. Si 2 a 3 ratones mueren dentro de 24 horas: Positivo para una o más de las toxinas del grupo AO, DTXs y PTXs (sobre niveles establecidos en Regulación (EC) 853/2004).		
	10.7.2. Si 2 ó más ratones muertos dentro de primeros 15 minutos: No concluyente.		

ANÁLISIS DE VENENO AMNÉSICO EN MOLUSCOS BIVALVOS.

Cod	Puntos de Control	Calif.	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
11	Extracción		
11.1	Se pesa muestra preparada según 3.1 a 3.7 y se adiciona metanol-agua 1:1		
11.2	Homogenización en:		
	11.2.1. Homogenizador a 10.000 rpm.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Calif.	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
	11.2.2. Licuadora a velocidad media.		
11.3	Se centrifuga		
11.4	Sobrenadante es:		
	11.4.1. Filtrado		
	11.4.2. Centrifugado por segunda vez.		
12	Análisis con HPLC		
12.1	Temperatura ambiental es regulada con el fin de no afectar las condiciones de separación.		
12.2	Se estabiliza línea base con fase móvil		
12.3	Se confirma linealidad de curva de calibración, es decir, $R^2 > 0.99$.		
12.4	Se lleva control de la cromatografía a través de cartas control que incluyan la variación de la señal del estándar de Ácido Domoico en el tiempo.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Calif.	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
12.5	En caso de equipo sin inyección automática, el inyector es limpiado al cambiar de muestra.		
12.6	Se lleva a cabo otros controles que permitan evidenciar un adecuado comportamiento de la cromatografía.		
13	Cálculo de la concentración de ácido Domoico		
13.1	<p>Cálculo de concentración::</p> $[\text{Ac. domoico}] (\mu\text{g/g}) = \frac{A_s \times C_c \times F}{A_c \times WT}$ <p>As: Promedio de las áreas de los peak de la muestra Ac: Promedio de las áreas de los peak de los estándares de calibración Cc: Concentración del estándar de calibración. WT: Peso de la muestra homogenizada. F: Factor de dilución.</p>		
13.2	El Laboratorio cuenta con carta de control de calidad del análisis mediante HPLC, informada a Sernapesca.		

SERNAPESCA

Cod	Puntos de Control	Calif.	OBSERVACIONES (Documentación evaluada/ evidencia)
14	Normativa Sernapesca		
14.1	Plazo entre muestreo e inicio de análisis: ≤ 24 horas desde todas las regiones menos la XII región. ≤ 48 horas desde XII región.		
14.2	En caso que las muestras no cumplan con los requisitos de recepción, establecidos por Sernapesca, se da aviso a dicho Servicio para autorizar la recepción de las éstas.		
14.3	Se cumple el plazo de (exclusivo PSMB): ≤ 12 horas para ingresar resultados al MR-SAT. ≤ 48 horas para enviar Informe de Resultados y Copia de Formulario de Envío de Muestras PSMB a D.N (mediante correo ordinario). ≤ 2 horas para informar resultados desfavorables a D.N., Oficina Regional de Sernapesca e Interesado (mediante correo electrónico).		

Firma Inspector: _____