

SECRETARÍA DE SALUD
COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA
RIESGOS SANITARIOS
COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE
COBERTURA

PROGRAMA MEXICANO DE SANIDAD DE MOLUSCOS
BIVALVOS
GUÍA PARA EL LABORATORIO DE ANÁLISIS DE AGUA DE
MAR Y MOLUSCOS BIVALVOS

México, 2016.

SECRETARÍA DE SALUD

José Narro Robles

COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS

Julio Sánchez y Tepoz

COMISIÓN DE CONTROL ANALÍTICO Y AMPLIACIÓN DE COBERTURA

Armida Zúñiga Estrada

DIRECCIÓN EJECUTIVA DE CONTROL ANALÍTICO

Imelda Rocío Guzmán Cervantes

DIRECCIÓN EJECUTIVA DE INNOVACIÓN

Josefina Gutiérrez Ramírez

COMITÉ TÉCNICO DE LABORATORIOS DEL PMSMB

LESP Baja California

Esperanza Romo Rodríguez

Ramona Padilla Salas

LESP Baja California Sur

Karla Verónica Lucero Savin

Jorge Paul Castro Cosío

LESP Sonora

Candia Plata

Alma Encinas

CCAYAC / COFEPRIS

Arturo Vargas Tapia Prandiz

Gabriela Muciño Brito

César Omar Gálvez González

ÍNDICE

1. Generalidades

1.1. Objetivo

1.2. Los Laboratorios y el PMSMB

1.3. El sistema de aseguramiento de calidad en los Laboratorios que participan en el PMSMB

2. Evaluación de los laboratorios del PMSMB

2.1. Los Laboratorios que apoyan al PMSMB y la evaluación por parte de la USFDA para su participación en el NSSP

2.2. Evaluadores

2.2.1. Responsabilidades del evaluador ante la USFDA

2.2.2. Mantenimiento del reconocimiento del evaluador reconocido por la FDA

3. Requisitos de operación de los Laboratorios

3.1. Equipos

3.1.1. Incubadoras

3.1.2. Termómetros

3.1.3. Hornos

3.1.4. Autoclaves

3.1.5. Potenciómetro

3.1.6. Balanzas

3.1.7. Pipetas

3.1.8. Micropipetas mecánicas o electrónicas.

3.1.9. Baños de agua.

3.2. Materiales

3.2.1. Utensilios para preparación de medios de cultivo

3.2.2. Campanas de durham

3.2.3. Pipeteros

3.2.4. Frasco de dilución o tubos

3.2.5. Tubos de fermentación

3.2.6. Frascos de muestreo

3.3. Lavado y esterilización

3.3.1. Lavado

3.3.2. Esterilización

3.4. Agua

3.5. Medios de cultivo

3.5.1. Preparación de medios de cultivo

3.5.2. Almacenamiento de medios de cultivo

3.5.3. Ajuste de pH

3.5.4. Esterilización

3.6. Control de calidad de los medios de cultivo y del método de análisis para coliformes fecales

3.6.1. Materiales

3.6.2. Procedimiento para el control positivo (*Escherichia coli*)

3.6.3. Procedimiento para el control negativo (*Enterobacter aerogenes*)

4. Toma de muestras, transporte y recepción de muestras de agua de mar y moluscos bivalvos de áreas de cultivo clasificadas para su análisis en el Laboratorio

4.1. Toma y transporte de la muestra

4.1.1. Agua de mar

4.1.2. Moluscos Bivalvos

4.2. Criterios para la recepción de las muestras

4.2.1. Envío-Recepción de muestras a CCAYAC

4.2.2. Envío-recepción de muestras en los LESP

4.2.3. Recepción de muestras de agua de mar

4.2.4. Recepción de moluscos bivalvos

4.2.5. Envío de extracto para confirmación a CCAYAC.

5. Análisis de Agua de mar y Moluscos Bivalvos

5.1. Preparación de las muestras para su análisis

5.1.1. Desconche

5.1.2. Dilución y homogeneizado.

5.2. Métodos de análisis.

5.3. Informe de resultados

6. BIBLIOGRAFÍA

Las modificaciones realizadas entre la versión 2015 y la presente versión son destacados con una línea debajo del texto.

1. GENERALIDADES

1.1. OBJETIVO

El presente documento tiene por objetivo orientar a los laboratorios en el cumplimiento de los requisitos técnicos analíticos del Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB), incluyendo el *National Shellfish Sanitation Program* (NSSP) que se sustenta en la Declaración de Cooperación entre la *Food and Drug Administration* (FDA) y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

Estos requisitos aplican a todos los Laboratorios públicos y privados que realizan actividades analíticas en muestras de moluscos bivalvos y productos de la pesca en general tanto para comercialización y consumo nacional como la exportación a diferentes países. Los requisitos del programa se encuentran descritos en la [guía técnica del PMSMB](#).

1.2. LOS LABORATORIOS Y EL PMSMB

La [guía técnica del PMSMB](#), tiene como principio fundamental, ofrecer los lineamientos para el comercio internacional de moluscos bivalvos y productos de la pesca, aunque estos también aplican al interior de los Estados Unidos Mexicanos en los puntos compatibles, descritos en la NOM-242-SSA1-2013. *Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados*. Es importante señalar que, con fines de exportación de dichos productos, se deben considerar los acuerdos que se suscriben con cada país o región del mundo.

Un componente fundamental del PMSMB y del NSSP, lo constituyen los Laboratorios que analizan la calidad de los moluscos bivalvos y el agua de mar de las áreas de cosecha de las cuales son extraídos. Los resultados bacteriológicos y de toxicidad de las muestras de agua y producto, son ampliamente usados en el PMSMB para sustentar científicamente que el riesgo sanitario por el consumo de moluscos bivalvos se encuentra dentro de los niveles de aceptación. La experiencia en el análisis de biotoxinas en moluscos y de calidad microbiológica de agua de las áreas de cosecha, indica que se debe mantener un apego estricto a las metodologías analíticas establecidas y que este trabajo debe sustentarse en sistemas de gestión y aseguramiento de la calidad, con el fin de garantizar la calidad de los resultados analíticos. Así mismo, deben controlarse las condiciones de la toma, manejo y transporte de muestras al Laboratorio.

Para el PMSMB se distinguen dos tipos de Laboratorios:

Laboratorios que apoyan al PMSMB.

Son Laboratorios **Terceros Autorizados** (estatales o privados) por la COFEPRIS y que además, cumplen con los requisitos del PMSMB, descritos en este documento y en la [guía técnica del PMSMB](#). Son supervisados y auditados por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC) para ese propósito en particular. Los resultados que emiten pueden ser utilizados con fines de control y vigilancia nacional de las áreas de cosecha o de los productos que de ellas se extraen.

Laboratorios reconocidos por la FDA-NSSP.

Son Laboratorios Terceros Autorizados por la COFEPRIS que, además de cumplir con los requisitos y características señalados en el párrafo anterior, son auditados por expertos técnicos de la FDA con base en la guía técnica establecida para tal efecto y, en caso de demostrar el apego estricto a la misma se denominan “Conformes con los lineamientos de la FDA”. Estos Laboratorios son los únicos cuyos resultados son utilizados con fines de control y vigilancia de las áreas de cosecha o de los productos que de ellas se extraen, con fines de exportación de moluscos bivalvos a los Estados Unidos de Norteamérica.

Los requisitos para la evaluación de los Laboratorios que analizan muestras para el PMSMB se encuentran alineados con los requisitos de los Laboratorios de prueba Terceros Autorizados y con los lineamientos del NSSP. El listado de dichos Laboratorios se encuentra en la siguiente liga: [Listado de los Laboratorios que apoyan al PMSMB/NSSP](#).

1.3. EL SISTEMA DE ASEGURAMIENTO DE CALIDAD EN LOS LABORATORIOS QUE PARTICIPAN EN EL PMSMB

Para asegurar la uniformidad en el desempeño de todos los Laboratorios que apoyan al PMSMB, es necesario que los Laboratorios cuenten con un Sistema de Gestión de Calidad basado en la norma mexicana NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025) que considera el cumplimiento particular de los siguientes puntos:

- La estructura de la organización y la administración del Laboratorio.
- Los programas aplicados para asegurar que el personal del Laboratorio esté calificado, capacitado y supervisado.
- Los procedimientos y métodos aplicados para recibir y analizar muestras.
- Las medidas de control de calidad, los límites de frecuencia y tolerancia para determinar el funcionamiento de equipos.

- La conservación de registros sobre funcionamiento, resultados de control de calidad, calibración y mantenimiento del equipo.
- Contar con un Programa de Aseguramiento de la Calidad, con el propósito de fundamentar la validez de los resultados analíticos. Dicho programa, requiere una aplicación sistemática para eliminar o reducir al mínimo, los errores que pueden ocurrir en cualquier operación de Laboratorios causados por personal, procedimientos, equipo, medios, reactivos, toma de muestras y método de análisis.
- Participar en un Programa para la Evaluación Externa o Evaluación del Desempeño de los Laboratorios, como parte integral del Programa de Aseguramiento de la Calidad.
- Recibir evaluaciones técnicas por parte de la COFEPRIS y en su caso, de técnicos de la FDA y de autoridades sanitarias de otros países.

Realizar acciones correctivas para cualquier deficiencia encontrada en el programa de Aseguramiento de la Calidad del Laboratorio.

2. EVALUACIÓN DE LOS LABORATORIOS DEL PMSMB

2.1. LOS LABORATORIOS QUE APOYAN AL PMSMB Y LA EVALUACIÓN POR PARTE DE LA USFDA PARA SU PARTICIPACIÓN EN EL NSSP

Cualquier Laboratorio no conforme o candidato a ser un Laboratorio reconocido por la USFDA (*United States, Food and Drug Administration*) como Laboratorio conforme con los requisitos del NSSP debe, en primer lugar, ser un Laboratorio TA y en segundo lugar, ser un Laboratorio conforme con los requisitos del NSSP.

Las auditorías a estos Laboratorios se realizan para mantener por un lado, su vigencia como Tercero Autorizado (ver guía de evaluación de [Terceros autorizados](#)) y por otro, el reconocimiento de la FDA por el cumplimiento de los [requisitos del NSSP](#) a través del uso de la [guía de evaluación del NSSP](#). Se debe insistir que el reconocimiento de la COFEPRIS como Laboratorio Tercero Autorizado para el PMSMB en las pruebas de producto y agua de mar, no significa que éste es conforme con el NSSP. Para tal propósito se debe aprobar satisfactoriamente la auditoría de los Evaluadores Oficiales de Laboratorio, LEO por sus siglas en inglés de la USFDA, dicha auditoría es gestionada por COFEPRIS a solicitud del Estado productor, sólo para los Laboratorios autorizados en los métodos y lineamientos del PMSMB y que han sido evaluados por el equipo de la CCAYAC, demostrando que cumplen con la guía de evaluación del NSSP.

Si el resultado de la evaluación por la USFDA es satisfactorio, el laboratorio adquieren el estatus de “conforme” con el NSSP-FDA y los resultados pueden ser utilizados para exportación de productos en los que se refiere a la clasificación de áreas y la vigilancia de las biotoxinas.

El sistema de evaluación de los laboratorios se encuentra descrito en la [guía técnica del PMSMB](#), en el capítulo 3.

2.2. EVALUADORES

Los evaluadores del PMSMB/NSSP, son personal reconocido por la USFDA para este propósito específico considerando que los candidatos deben cumplir con los siguientes criterios:

- El candidato debe ser parte de un Laboratorio de referencia (CCAYAC) o de los Laboratorios estatales reconocidos por la USFDA como conforme con los requisitos del NSSP. El evaluador no podrá evaluar su propio Laboratorio.
- El candidato debe ser un analista experimentado y debe tener experiencia como supervisor o como auditor. Los evaluadores tendrán la responsabilidad de realizar supervisiones frecuentes

a los Laboratorios reconocidos para asegurar el cumplimiento de los requisitos de NSSP o recomendar cuando un Laboratorio pueda ser evaluado por la FDA.

- Los candidatos deben participar de modo conjunto con los LEO-USFDA durante las evaluaciones en sitio de Laboratorios y deben demostrar su competencia en la evaluación de la capacidad del Laboratorio para apoyar el PMSMB/NSSP.
- El evaluador debe llevar a cabo y documentar la evaluación utilizando la versión vigente de la Guía de evaluación de Laboratorios del NSSP.
- El informe de la visita de evaluación deberá realizarse mediante la guía de evaluación y/o una cédula de seguimiento, en la que se especifica: fecha del hallazgo, descripción de los hallazgos que afectan las actividades del PMSMB, el método afectado, el punto de la guía que se incumple, el tipo de hallazgo, las acciones tomadas, la fecha y el seguimiento a las acciones y su efectividad.
- La USFDA emitirá alguna comunicación informando el nombre de sus enlaces técnicos responsables de la supervisión de los Laboratorios.

2.2.1. RESPONSABILIDADES DEL EVALUADOR ANTE LA USFDA

- Realizar auditorías de los Laboratorios en sitio por lo menos una vez al año.
- El seguimiento de las acciones implementadas se realizará a través del correo electrónico (pmsmb.ccayac@gmail.com), teleconferencias, videoconferencias y utilizando la cédula de seguimiento de cada Laboratorio. Adicionalmente, se realizarán visitas de supervisión en los Laboratorios que se encuentran condicionados o cuando se han realizado grandes cambios en las cargas de trabajo o prioridades, cuando se ha producido una rotación sustancial de personal o a petición expresa de las autoridades estatales o líderes del PMSMB.
- Resguardar copia de las guías de evaluación llenadas.
- Proporcionar los informes de evaluación a los LEO-USFDA cuando así lo soliciten.
- Elaborar, coordinar y llevar a cabo las pruebas de competencia anual para todos los Laboratorios reconocidos por el PMSMB y el NSSP.
- Mantener una lista actualizada del estatus de cada laboratorio que apoya el PMSMB – NSSP.

2.2.2. MANTENIMIENTO DEL RECONOCIMIENTO DEL EVALUADOR RECONOCIDO POR LA FDA

El evaluador debe tener en cuenta los siguientes criterios para mantener el reconocimiento:

- Debe ser parte del Laboratorio de referencia o de los Laboratorios estatales conformes para el PMSMB y el NSSP.
- No ser el director de cualquiera de los Laboratorios evaluados.
- Debe demostrar competencia continua en la evaluación de la capacidad de los Laboratorios que apoyan al PMSMB y al NSSP. Es conveniente participar en evaluaciones conjuntas con los LEO-USFDA.
- Mantener el archivo de las evaluaciones de los Laboratorios y los resultados de sus pruebas de desempeño.

3. REQUISITOS DE OPERACIÓN DE LOS LABORATORIOS

3.1. EQUIPOS

El personal que utiliza equipos e instrumentos debe demostrar conocimiento del uso de cada equipo y contar con la autorización de uso. Dicha autorización se otorga tras la realización de una capacitación y una evaluación escrita y práctica del uso fundamento y uso del del equipo.

Los laboratorios deberán contar con criterios de aceptación de los servicios de calibración y calificación, que les permita decidir si el instrumento o equipo puede continuar en uso o se requiere alguna acción. Estos criterios deberán estar basados en los que se indica en este manual o en su ausencia en los criterios publicados por CCAYAC, lo indicado en la normatividad nacional o referencia internacional.

3.1.1. INCUBADORAS

EQUIPO

Las incubadoras deben mantener, durante todo el tiempo de uso, una temperatura interna uniforme y constante en todas las áreas donde se utilicen. Esto puede lograrse utilizando modelos con revestimiento o chaqueta de agua o de tipo anhidro, con control de termostato para bajas temperaturas, equipadas con resistencia eléctrica de calentamiento aislada y localizada cerca de paredes y pisos de la cámara; preferentemente, deben estar equipadas con un sistema de recirculación del aire (ventilador).

Las incubadoras que poseen termostatos de calentamiento para altas temperaturas, no cumplen con estos requisitos debido a que sus fuentes de calor, de manera frecuente provocan un sobrecalentamiento y resequedad en los medios de cultivo, con la consecuente falla en el desarrollo de las colonias.

CONTROL DE CALIDAD

La temperatura del Laboratorio en donde se instalen las incubadoras, deberá mantenerse entre 16°C – 27°C. a menos que se indique otra cosa por el fabricante del equipo.

La temperatura dentro de la incubadora para Coliformes Fecales, no debe variar más allá de 35°C ± 0.5°C.

La temperatura dentro de la incubadora para determinar Ácido Okadaico debe ser de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, cuando no se utilizan lector de placas automatizado de ELISA con incubación de placas, en ese caso el equipo Elisa deberá estar calificado a esta temperatura.

En caso de utilizar incubadoras de piso, se deben utilizar por lo menos, dos termómetros (uno en la parte superior y otro en la parte inferior). Las temperaturas deben registrarse dos veces al día (una por la mañana y otra en la tarde). No tomar lecturas durante o inmediatamente después de aberturas excesivas de la puerta. Permitir que la incubadora recupere su temperatura normal después de cerrar la puerta, por un tiempo razonable. Se pueden usar, también, equipos de registro automatizado de temperatura pero, se debe determinar su precisión semanalmente comparando sus lecturas con el termómetro usado en la incubadora y registrar los resultados.

Las incubadoras deben estar provistas de anaqueles separados que aseguren la uniformidad de la temperatura en toda la cámara. Debe existir un espacio de 2.5 cm, entre el material a incubar y las paredes de la cámara así como, entre el mismo material.

Para el caso de las cajas Petri, no es adecuado apilar más de cuatro cajas.

3.1.2. TERMÓMETROS

Los termómetros deben colocarse en los lugares más representativos de la incubadora, anotando las lecturas de temperatura por lo menos dos veces al día con un intervalo no menor a 4 horas entre una lectura (por la mañana) y otra (por la tarde).

Para los métodos microbiológicos se deben usar como termómetros de referencia, termómetros de inmersión total de mercurio en vidrio (ASTM-64C) o no-mercurio en vidrio (ASTM-S64C) conforme se describe en los siguientes criterios de verificación y calibración.

Los termómetros de referencia (mercurio/vidrio o no mercurio/ vidrio), deben estar graduados en incrementos de 0.1°C , de 25°C a 55°C con una escala auxiliar a 0°C de 379 mm de longitud. Los termómetros de referencia deben estar calibrados por un Laboratorio acreditado que utilice un patrón primario trazable al CENAM o al NIST el informe de calibración debe describir esta información. La calibración sólo debe realizarse al inicio de la vida de uso del termómetro y anualmente verificarse en el punto de congelación, cualquier cambio en éste, se interpretará como un cambio de igual magnitud en toda la columna de mercurio y debe considerarse en los cálculos.

Se deben usar como termómetros de trabajo, termómetros de inmersión total de mercurio en vidrio (ASTM-64C) o no-mercurio en vidrio (ASTM-S64C) como se describe en criterios de verificación y calibración

Los termómetros de trabajo, deben estar colocados en tubos de plástico transparente, con un diámetro < 2 cm. Se debe cuidar que el bulbo esté suspendido y no toque el fondo del tubo. El propósito de colocar los termómetros dentro de este tubo es, poder llenarlo con un medio que pueda distribuir adecuadamente la temperatura; para este caso se utiliza agua la cual cubrirá los termómetros hasta 6-12 mm por debajo de la temperatura de lectura. Al iniciar cada día de trabajo y antes de hacer la lectura se debe verificar el nivel del agua, y si fuera necesario se debe hacer la corrección. El personal que verifica los termómetros debe tener la capacidad para ajustar el nivel de agua. La lectura de la temperatura deberá realizarse con el termómetro en posición vertical.

Los termómetros deben almacenarse inclinados, nunca horizontales.

En la siguiente liga se encuentra un video con la [Información para preparar el tubo del termómetro](#).

Los termómetros de trabajo para coliformes fecales deben verificarse anualmente a la temperatura de uso (por ejemplo 35.0°C, 44.5°C) contra el termómetro patrón o de referencia, incluyendo la temperatura de congelación (0 °C). Esto se debe hacer, colocando ambos termómetros en un baño o bloque de calibración (se recomienda marca Fluke).

CRITERIOS DE CALIBRACIÓN O VERIFICACIÓN

- Los termómetros de trabajo usados a 44.5°C, deben verificarse por comparación contra un termómetro de referencia, la diferencia de las lecturas debe ser de $\pm 0.1^\circ\text{C}$; para el punto de congelación (0 °C) debe ser de $\pm 0.0^\circ\text{C}$. Cuando no se cumpla con este criterio el termómetro debe retirarse o destinarse a otro uso. Las lecturas de temperatura realizadas con termómetros que cumplan este criterio, deben registrarse sin realizar corrección alguna en la hoja de registro.
- Los termómetros de trabajo usados a 35°C, deben verificarse por comparación contra un termómetro de referencia, la diferencia de las lecturas debe ser de $\pm 0.2^\circ\text{C}$; para el punto de congelación (0 °C) debe ser de $\pm 0.0^\circ\text{C}$. Cuando no se cumpla con este criterio el termómetro debe retirarse de su uso. Las lecturas de temperatura realizadas con termómetros que cumplan este criterio, deben registrarse sin realizar corrección alguna en la hoja de registro.
- Los termómetros de trabajo usados en refrigeradores deben verificarse a 0°C contra un termómetro de referencia, y la variación debe ser de 0°C +/-0.0°C y a 4°C la diferencia de las lecturas debe estar

entre $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Cuando no se cumpla con este criterio el termómetro debe ser retirado de su uso. Las temperaturas leídas con los termómetros que cumplan esta especificación deben ser registradas sin realizar corrección de la lectura.

- Los termómetros de trabajo usados a 30°C , deben verificarse por comparación contra un termómetro de referencia, la diferencia de las lecturas debe ser de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Cuando no se cumpla con este criterio el termómetro debe retirarse de su uso. Las lecturas de temperatura realizadas con termómetros que cumplan este criterio, deben registrarse sin realizar corrección alguna en la hoja de registro.
- Otros termómetros de trabajo deben verificarse utilizando los criterios publicados por CCAYAC.

Otros termómetros de trabajo deberán ser verificados conforme a los criterios publicados por CCAYAC.

Los termómetros patrón o de referencia, deben calibrarse anualmente en el punto de congelación (0°C), cualquier cambio en éste, se interpretará como un cambio de igual magnitud en toda la columna de mercurio, por lo que ese termómetro debe retirarse inmediatamente de su uso.

Los termómetros de mercurio o no mercurio (trabajo o referencia) usados para monitorear temperaturas en el rango de los $0 - 45.5^{\circ}\text{C}$, deben ser revisados y mantener registros de la ausencia de fraccionamiento de la columna, los termómetros que no cumplan el criterio deben de ser retirados inmediatamente de su uso

3.1.3. HORNOS

Los hornos de aire caliente, deben ser de suficiente tamaño que eviten la sobrecarga interna, construidos de tal manera que proporcionen una temperatura de esterilización adecuada, equipados con termómetros capaces de registrar con exactitud intervalos de 160°C a 180°C . El usar registradores de altas temperatura es opcional pero deseable.

CONTROL DE CALIDAD

El desempeño del horno debe verificarse cada tres meses utilizando tiras comercialmente disponibles de indicadores biológicos para esterilización por calor seco. **Precaución: En los hornos no se deben utilizar ampollitas de vidrio.**

3.1.4. AUTOCLAVES

Las autoclaves deben ser de tamaño suficiente para evitar una sobrecarga interna y proporcionar una temperatura uniforme dentro de la cámara hasta alcanzar la temperatura de esterilización de 121°C. (La marca Market-Forge® cumple con estos requisitos). Equipadas con dataloggers de trabajo verificados anualmente a la temperatura de ebullición y 121°C que cumplan con un criterio de ± 1 °C (los dataloggers de referencia patrón deberán ser calibrados cada 5 años). Los manómetros y las válvulas de seguridad deben estar ajustadas y calibradas conectadas directamente ya sea a la línea del suministro de vapor o al generador de vapor. La autoclave debe ser capaz de alcanzar la temperatura deseada en menos de 30 min.

CONTROL DE CALIDAD

Cada ciclo de esterilización deberá ser evaluado con un indicador biológico (sterikon plus)

REGISTROS

Se deben mantener registros de cada ciclo de esterilización donde se incluyan: fecha, hora de entrada del material (medio de cultivo) al autoclave, hora de inicio y finalización del ciclo de esterilización (121 °C durante 15 minutos para el caso de los medios de cultivo), hora de la salida del material de la autoclave, tiempo total de exposición al calor (<45 min para medios de cultivo con carbohidratos), material esterilizado y operador del ciclo. Mantener registros de cada corrida, verificación de la esterilización (esporas) así como, el mantenimiento y reparaciones realizadas a la autoclave.

3.1.5. POTENCIÓMETRO

INSTRUMENTO

Utilizar medidores de pH (potenciómetros) electrónicos, con una exactitud de por lo menos 0.1 unidades de pH para determinar el pH de los medios de cultivo y reactivos. Éste debe estar equipado con un dispositivo corrector automatizado de temperatura (ATC) y con barrera de doble unión que evite el intercambio de iones Ag/AgCl.

CONTROL DE CALIDAD

Medir el pH únicamente a temperatura ambiente (16°C-27°C). El instrumento debe calibrarse antes de cada medición, usando soluciones de referencia (por ejemplo: pH 2.0, 4.0, 7.0 y 10.0) de acuerdo con lo indicado en el instructivo del instrumento y el método de prueba.

Las soluciones buffer deben usarse solo una vez y desecharse.

Determinar la pendiente cada vez que se haga la calibración del potenciómetro, ya sea que el instrumento lo realice automáticamente o se calcule con las lecturas de milivolts (mV). La pendiente es una función, reportada como porcentaje (%) de la medida de los mV dividida entre su valor teórico. La pendiente esperada debe estar entre 95 % - 102 %, en el caso de que no se cumpla este criterio, el electrodo debe sustituirse por uno nuevo para lo cual, el Laboratorio tendrá contemplada esta condición.

MANTENIMIENTO

En todo caso seguir siempre las instrucciones del fabricante. En general, el electrodo se debe limpiar periódicamente usando limpiadores para electrodos comercialmente disponibles o con NaOH 0.1 N. El electrodo en uso, se debe mantener sumergido en una solución buffer a pH 7.0 o de preferencia, en una solución de almacenaje para electrodos recomendada por el fabricante. Los electrodos rellenables deben conservarse apropiadamente llenos con la solución recomendada por el fabricante. Vaciar y reemplazar soluciones de llenado si existe la aparición de cristales. Se deberá quitar el tapón de plástico en los electrodos rellenables del orificio de relleno para hacer las lecturas de pH. Colocar nuevamente este tapón, después de haber hecho la lectura para evitar la evaporación y la formación acelerada de cristales. Cuando se utilicen electrodos no rellenables, el Laboratorio debe contar con los repuestos suficientes para su cambio, la falta de estos repuestos se considera como un hallazgo crítico.

REGISTROS

Se deben mantener registros de las calibraciones de pH, cálculos de las pendientes y la fecha en la que el electrodo se puso en servicio. Registrar todas las medidas de pH realizadas con el instrumento y mantenimientos realizados al equipo. Mantener los registros de todo el mantenimiento y reparaciones realizadas.

En caso de utilizar papel pH (para los homogeneizados en la extracción de biotoxinas marinas), éste debe tener un intervalo de 1–6, con una variación de 0.5 unidades de pH.

3.1.6. BALANZAS

Para microbiología y métodos rápidos de biotoxinas utilizar balanzas que proporcionen una sensibilidad de por lo menos 0.1g

Para métodos cromatograficos usar balanzas con sensibilidad de 0.01g y cuando se pesen materiales menores a 2g se debe usar una balanza analítica con sensibilidad de 1 mg.

Siquiendo el CCAYAC-CR-013 y los de las guías de evaluación Las balanzas deben ser verificadas cada día de uso, utilizando como mínimo dos pesas próximas los pesos de uso, los pesos de uso se deben encontrar en el intervalo de las pesas certificadas utilizadas.

Se sugieren los siguientes son ejemplos de pesas sugeridas:

- Para medios de cultivo se debe verificar los pesos de 10 g, 50 g ó 100 g si se pesa directamente sobre el recipiente en el que se prepara el medio se deberá incluir 500 g ó 1000 g dependiendo del peso del recipiente.
- Para SRT-PSP 100 g y 500 g
- Para PP2A y SRT-ASP 5 g y 20 g o 50 g

Las balanzas deben estar calibradas anualmente.

3.1.7. ESPECTROFOTÓMETRO (LECTOR DE MICROPLACAS)

INSTRUMENTO

Utilizar espectrofotómetros de barrido de microplacas de hasta 96 pozos o similar, con una sensibilidad de ± 0.01 nm con un filtro de 405 nm, de preferencia con cámara de incubación integrada, calificada a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con una sensibilidad de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

CONTROL DE CALIDAD

Utilizar agua grado reactivo, libre de impurezas; para medir el ruido de fondo a 405 nm y asegurar que el equipo se encuentra dentro de las condiciones de operación. Además, se deberá optar por la calibración del equipo cuando no se disponga de las placas de verificación espectrofotométrica de cristal de densidad neutra con absorbancia a 405 nm (de acuerdo al tipo de equipo y fabricante), mantener registros de estos servicios.

MANTENIMIENTO

En todo caso seguir siempre las instrucciones del fabricante. En general, se deberá realizar la limpieza de los filtros de acuerdo al manual de usuario, y únicamente con las soluciones que en este se especifican; este servicio deberá realizarse por una persona entrenada y bajo supervisión, se deben de realizar los procedimientos de "check" interno cuando se encuentren disponibles en el aparato.

REGISTROS

Se deben mantener registros de las calificaciones y calibraciones realizadas al equipo, así como de cada uno de los mantenimientos realizados, las corridas analíticas, las temperaturas máximas y mínimas de la cámara de incubación mientras el proceso (por lo menos 2, al inicio y final del proceso) y un registro de las absorbancias obtenidas con el filtro utilizado. Se debe especificar claramente el estado del equipo.

3.1.8. PIPETAS

El pipeteo con la boca no está permitido para ninguna operación en el Laboratorio.

Las pipetas pueden ser de vidrio borosilicato o plástico desechables o reutilizables estériles, deben operarse usando bulbos o propipetas. Deben ser de material no tóxico, conforme con lo establecido en el método de prueba y no presentar algún daño. Deben ser de tamaño adecuado que permita tomar el volumen requerido de manera precisa y rápida. Las puntas o boquillas no deben estar rotas. Se deben descartar las pipetas con puntas o boquillas rotas. Las pipetas deben estar graduadas y marcadas de forma

clara. No usar pipetas mayores al 10% del volumen a transferir. No utilizar pipetas mayores a 10 mL para transferir 1 mL. No utilizar pipetas mayores a 1 mL para transferir volúmenes de 0.1 mL.

El material volumétrico debe verificarse anualmente o de acuerdo con su uso y variación, no debe ser mayor a la tolerancia permitida a la clasificación del material.

. Las pipetas desechables deben utilizarse solo una vez y desecharse. Para el análisis microbiológico, usar solo pipetas bacteriológicas. Las pipetas de transferencia clásicas, deben ser adquiridas con las siguientes especificaciones de la APHA:

Tolerancia y Precisión:

Capacidad (mL)	Graduadas en (mL):	Tolerancia (mL)	Precisión* (mL)
1.0	0.10	± 0.01	± 0.01
5.0	0.10	± 0.02	± 0.02
10.0	0.10	± 0.03	± 0.03

*Todas las pipetas para transferir deben cumplir con esta precisión a 20 °C. Los volúmenes se deben transferir en 2 a 4 segundos.

Pro-pipetas: Están disponibles varias pro-pipetas, llenadoras, dispensadores o bombas con el fin de evitar una contaminación y el riesgo por el pipeteo con la boca, el cual, está prohibido.

VALORES DE TOLERANCIA DE LAS PIPETAS

Solo se deben usar pipetas Clase A con las tolerancias especificadas en los métodos de prueba. La precisión es crítica para las determinaciones químicas.

Dado que, las tolerancias están certificadas por los fabricantes o proveedores, no es necesario volver a verificar el volumen de las pipetas a menos, que se sospeche de algún problema.

VERIFICACIÓN

La verificación de las pipetas se debe realizar de acuerdo con los criterios publicados por CCAYAC.

PIPETAS DE TRANSFERENCIA (TD)

Están diseñadas para descargar la cantidad precisa, cuando la punta de la pipeta está apoyada sobre las paredes del recipiente receptor hasta que el drenado se detiene. Ciertas clases de pipetas serológicas, están calibradas para descargar el volumen indicado con una pequeña cantidad remanente de líquido en la punta cuando la descarga ha terminado. Estas pipetas pueden estar marcadas con un anillo ancho opaco, dos anillos angostos opacos o dos anillos impresos cerca de la boquilla.

PIPETAS PARA CONTENER (TC)

Este tipo de pipetas están calibradas para contener la cantidad especificada. Deben estar completamente vacías para asegurar descargar el volumen especificado. Estas pipetas son utilizadas en muchas operaciones en donde se hace necesaria la precisión en las diluciones, lo que se logra haciendo un enjuague de la pipeta después de la descarga inicial con solución de diluciones.

Si se usan pipetas desechables estériles, se debe verificar su esterilidad por lote de fabricación, seleccionando probabilísticamente una cantidad representativa de pipetas.

Si se usan pipetas reutilizables, éstas deben demostrar su esterilidad, por lote de esterilización.

3.1.9. MICROPIPETAS MECÁNICAS O ELECTRÓNICAS.

Existen numerosas variedades de micropipetas que pueden usarse en el análisis. Estas pueden ser mecánicas o electrónicas. Mientras que estos instrumentos pueden adquirirse de volumen variable o fijo, es preferible usar micropipetas calibradas a volúmenes fijos. Existen puntas desechables estériles las cuales, pueden adaptarse para el análisis microbiológico. Se deben verificar los volúmenes de descarga, antes de utilizar cualquier micropipeta. Si no está marcada con el número de serie, se debe marcar permanentemente con una clave de identificación única.

CONTROL DE CALIDAD

Cuando no pueda determinarse la precisión midiendo el volumen descargado con una probeta graduada clase A (en el caso común de pipetas para volúmenes ≤ 1.0 mL) se debe utilizar el siguiente procedimiento para determinar la precisión por gravimetría. Este procedimiento está recomendado para todas las micropipetas que distribuyan volúmenes ≤ 1.0 mL.

VERIFICACIÓN DE MICROPIPETAS

Esta actividad se utiliza para verificar el volumen descargado por las micropipetas gravimétricamente. Tanto el equipo como el agua para la prueba, deben colocarse en un medio ambiente de entre 19°C a 24°C por lo menos, dos horas antes de la prueba. Se deben aplicar los criterios de verificación de pipetas emitidos por la CCAYAC.

Antes de cada uso, accionar la micropipeta repetidamente para permitir la distribución del lubricante y para asegurar un manejo suave. Las micropipetas se deben enviar con un técnico calificado, en caso de fallas en la verificación o por alguna reparación.

Se deben mantener los registros de cada calibración, verificación, mantenimiento y/o reparación que se realice a las micropipetas.

3.1.10. BAÑOS DE AGUA.

Los baños de agua deberán contar con una calificación de su desempeño, que demuestre una distribución homogénea de la temperatura en el intervalo indicado en el método o por el fabricante, el que sea menor.

El baño de agua para la determinación de coliformes fecales, por diseño debe mantener una temperatura de $44.5^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, independientemente de la carga de trabajo. El baño de agua debe tener tapa que evite la evaporación y la pérdida por calor, debe contar con recirculación del agua para asegurar una temperatura homogénea en cualquier punto. Además, para la verificación de la temperatura del baño, se debe utilizar un termómetro ASTM-S64C, ASTM-64C. Solo se pueden introducir gradillas hechas de acero inoxidable, látex, plástico, vinilo u otro material a prueba de corrosión.

El baño de agua para la determinación de PP2A fosfatasa, debe mantener una temperatura de $76^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El baño de agua debe tener tapa que evite la evaporación y la pérdida por calor. Además, para la verificación de la temperatura del baño, se debe utilizar un termómetro de 0°C a 100°C con divisiones de 1°C .

PRECAUCIONES

Asegurar que el nivel del agua esté siempre por encima del nivel del medio de cultivo o de la solución de reacción. Asegurar que el agua en el baño se mantenga limpia.

Registros: Mantener registros de la temperatura y de cualquier reparación o mantenimiento efectuado al baño de agua.

3.2. MATERIALES

3.2.1. UTENSILIOS PARA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Usar material de vidrio de borosilicato u otro material no corrosivo, deberá estar limpio y libre de materia extraña, otros materiales pueden ser utilizados como materiales de plástico con tapones de goma, tapas o tapones de rosca con revestimientos no tóxicos. Las graduaciones están indeleblemente marcados en botellas de dilución y tubos o un método alternativo aceptable se utiliza para asegurar los volúmenes adecuados. Los tubos de cultivo son de un tamaño adecuado para acomodar el volumen de ingredientes nutritivos y muestras

El material de vidrio deberá estar libre de rayaduras, rupturas, burbujas u otros defectos.

3.2.2. CAMPANAS DE DURHAM

Siempre deben ser nuevas, por ningún motivo reutilizarlas.

3.2.3. PIPETEROS

Cuando se utilicen pipeteros, éstos deben ser de aluminio o acero inoxidable; cilíndricos o rectangulares, con una longitud de 40 cm y un diámetro de 5 cm a 7.5 cm. Pueden sustituirse por envoltura de papel libre de sustancias tóxicas o que se adhiera a las pipetas. No utilizar pipeteros de cobre o aleaciones de cobre.

3.2.4. FRASCO DE DILUCIÓN O TUBOS

Utilizar frascos o tubos de vidrio resistente, de preferencia de borosilicato, con tapón de vidrio, hule, tapón de rosca o capuchón de acero inoxidable que no genere compuestos tóxicos o bacteriostáticos al momento de la esterilización. No usar tapones de algodón. La graduación de los frascos o tubos de dilución debe ser indeleble. Los frascos de plástico deben ser de materiales no tóxicos y de tamaño adecuado para sustituir a los de vidrio.

3.2.5. TUBOS DE FERMENTACIÓN

Utilizar tubos de fermentación de borosilicato con tapón de rosca o capuchón de acero inoxidable, de tamaño suficiente para contener el volumen requerido de medio de cultivo y muestra. Las tapas no deben desprender productos volátiles, tóxicos o bacteriostáticos durante la esterilización. No usar tapones de algodón.

3.2.6. FRASCOS DE MUESTREO

Para la recolección de muestras se recomienda el uso de frascos de plástico inerte, capaces de soportar la esterilización, deben tener la capacidad adecuada para que el volumen total de la muestra (>110mL) ocupe no más de tres cuartas partes del contenedor, se debe dejar un espacio suficiente de aproximadamente 2.5 cm para facilitar una adecuada homogeneización de la muestra en el Laboratorio. Todos los frascos deben esterilizarse y cada lote debe tener una prueba de esterilidad. Cuando los frascos se deforman después de la esterilización se deben rechazar y hacer un reclamo al fabricante.

Las muestras deben manejarse adecuadamente con el fin de prevenir su contaminación hasta completar el análisis. Se pueden utilizar frascos de plástico resistentes a la esterilización por autoclave (como el *Nalgene* de alta resistencia) a 121 °C durante 15 minutos, indeformables y que no produzcan sustancias tóxicas o bacteriostáticas. Las tapas pueden ser de rosca con empaques que no produzcan sustancias tóxicas o

bacteriostáticas con la esterilización. Cubrir los frascos con papel de aluminio u otro material resistente al agua hasta el cuello, antes de esterilizar.

3.3. LAVADO Y ESTERILIZACIÓN

3.3.1. LAVADO

Para la limpieza de todo el material del laboratorio se debe utilizar un detergente alcalino, enjuagar con agua potable para eliminar residuos y después enjuagar cuatro veces cambiando el agua cada vez. Hacer un enjuague final con agua destilada/desionizada. Los laboratorios pueden estandarizar otros procedimientos de lavado, que demuestren ser eficaces en el lavado y la eliminación de residuos de detergente.

Cuando se usen lavadoras automáticas para el lavado de material de Laboratorio, se deberán seguir protocolos sugeridos por el fabricante y la verificación de los resultados.

La efectividad del enjuague, se debe verificar diariamente y adicionando agua a los frascos y agitando, los materiales deben estar libres de formación de espuma. Además, tomar diariamente, algunas piezas del material de vidrio para determinar residuos de ácido o álcali, con una solución acuosa de azul de bromotimol al 0.04 % de entre 6 pH – 7 pH (ideal) en el material seco y mantener registros.

3.3.2. ESTERILIZACIÓN

El material de vidrio debe esterilizarse por no menos de 60 minutos a 170 °C. El material de vidrio dentro de recipientes metálicos debe calentarse a 170 °C por no menos de 2 horas. El uso de otras temperaturas de esterilización deberá estar validado.

Todo el material de plástico adecuado para la esterilización por calor húmedo debe esterilizarse en autoclave a 121 °C durante 30 minutos.

Cada ciclo de esterilización debe ser evaluado utilizando al menos una ampolleta de sterikon plus.

Se deben hacer controles de esterilidad al material para cada ciclo de esterilización y lote de material estéril recibido.

3.4. AGUA

Se deben utilizar equipos generadores de agua destilada/desionizada (destiladores, desionizadores u ósmosis inversa) con lectores integrados y calibrados de conductividad, no se recomienda el uso de garrafones de agua destilada. La resistividad debe ser de > 0.5 megaohm o < 2.0 μ Siemens/cm de conductividad a 25°C registrar la resistividad o conductividad, cada vez que se tome agua destinada al proceso en el Laboratorio. Mantener registros. Además, el agua debe contener < 100 UFC/mL, determinada mensualmente mediante el método de cuenta en placa. Mantener registros. El agua se debe analizar mensualmente para determinar cloro residual el cual, debe ser, no detectable equivalente a 0.1 mg/L (0.1 ppm) mantener registros y especificar el método de determinación. No se debe usar agua destilada o desionizada almacenada.

Para medios de cultivo no se requiere la determinación de metales pesados sin embargo para la preparación de los reactivos de biotoxinas, el agua debe estar libre de trazas de metales < 0.05 mg/L de Cd, Pb, Cr, Cu, Ni, and Zn un contenido de metales totales menor 0.1 ppm (mg/L) anualmente.

MANTENIMIENTO

Las unidades generadoras de agua deben tener una limpieza programada en la que se incluya el cambio de consumibles de acuerdo con lo recomendado por el fabricante o proveedor. Cuando los controles del agua se encuentren fuera de especificación se deberá realizar de manera inmediata el mantenimiento correctivo.

REGISTROS

Deben mantenerse registros de los resultados del control de calidad del agua y de todos los mantenimientos efectuados a las unidades generadoras de agua.

3.5. MEDIOS DE CULTIVO

3.5.1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo y reactivos se describe en los métodos de prueba.

Deben utilizarse medios de cultivo deshidratados, a menos que se indique otra cosa.

Cuando se utilicen medios de cultivo deshidratados se debe realizar control de calidad a cada lote de medio de cultivo del fabricante, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cuando se utilicen medios de cultivo preparados por ingredientes, el control de calidad se debe realizar por lote de medio de cultivo preparado.

3.5.2. ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo y los componentes deben estar adecuadamente almacenados en un ambiente frío, limpio y seco. Los medios deshidratados deben identificarse con la fecha de recepción y apertura.

Además el fabricante debe indicar la fecha de caducidad, después de la cual, el medio de cultivo no debe utilizarse. Mantener registros con cantidad, apariencia, número de lote y fecha de caducidad. Descartar medios de cultivo apelmazados o fuera de la fecha de caducidad. No usar reactivos o soluciones sin etiqueta, alterados o fuera de fecha de caducidad.

Todos los medios preparados en el Laboratorio deben ser identificados con nombre del medio, lote de preparación y fecha de almacenamiento máximo.

Particularmente, el caldo Lauril sulfato debe ser almacenado a temperatura ambiente por no más de 7 días, protegido de la luz. Todos los tubos deben ser inspeccionados y se deben descartar aquellos que presenten burbujas antes de su uso.

3.5.3. AJUSTE DE PH

El incremento en la concentración de los iones hidrógeno (disminución de pH) durante la esterilización, puede variar ligeramente de acuerdo con el autoclave que se use y la reacción inicial requerirá de un ajuste para obtener la reacción final correcta. Los descensos en las lecturas de pH usualmente deben estar entre 0.1 a 0.2, ocasionalmente mayores a 0.4. Cuando en los medios están presentes sales amortiguadoras como fosfatos, se espera que estos cambios de pH sean insignificantes; por lo que no se debe ajustar el pH de estos caldos, la verificación del pH debe hacerse solo al final del proceso de esterilización, éste debe cumplir con los intervalos de pH recomendado por el fabricante del medio deshidratado; cambios en el valor de pH, pueden ser asociados a la calidad del agua utilizada o defectos en la preparación.

3.5.4. ESTERILIZACIÓN

En general los medios se esterilizan en autoclave a 121°C +/- 2°C durante 15min o de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuando la presión llega a cero el medio debe sacarse de la autoclave para evitar su alteración. Para permitir un calentamiento uniforme y un enfriamiento rápido, los tapones deben estar ligeramente flojos.

Para medios de cultivo adquiridos comercialmente, se preparan y esterilizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El tiempo total de exposición de los caldos, no debe exceder 45 minutos, desde que se cierra la autoclave hasta que sacan los medios de cultivo. Mantener registros.

3.6. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA COLIFORMES FECALES

3.6.1. MATERIALES

- Cultivo en agares nutritivos (como cuenta estándar, agar soya tripticasa, agar base sangre) inclinado de *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*.
- Tubos con Caldo Lauril Triptosa o Caldo EC.
- Asas de inoculación.

3.6.2. PROCEDIMIENTO PARA EL CONTROL POSITIVO (*ESCHERICHIA COLI*)

Inocular un tubo de Caldo Lauril Triptosa con *Escherichia coli*. Incubar el tubo a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Tomar una asa desechable de $1\text{ }\mu\text{L}$ e introducirla en la suspensión. Inocular un frasco con 100 mL con $1\text{ }\mu\text{L}$ de la suspensión. Esto equivale a diluir la suspensión aproximadamente de entre 9 y 12×10^3 células/mL. Marcar el frasco de dilución y dejar a temperatura ambiente. Mantener por 7 días.

Cuando se necesite de un control positivo, agitar el frasco e introducir una asa desechable de $1\text{ }\mu\text{L}$ dentro del frasco de diluciones e inocular el tubo. El asa de inoculación debe tener de 9 a 12 células de *Escherichia coli*. Incubar el tubo junto con las muestras analizadas.

3.6.3. PROCEDIMIENTO PARA EL CONTROL NEGATIVO (*ENTEROBACTER AEROGENES*)

Usar un asa estéril o aguja de inoculación e inocular el tubo con el caldo directamente del cultivo en agar inclinado del control negativo. Para el control negativo, no es importante usar un número mínimo de células viables.

4. TOMA DE MUESTRAS, TRANSPORTE Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA DE MAR Y MOLUSCOS BIVALVOS DE ÁREAS DE CULTIVO CLASIFICADAS PARA SU ANÁLISIS EN EL LABORATORIO

Todas las muestras deben ser tomadas conforme a un programa de muestreo. El programa de muestreo debe hacerse del conocimiento del Laboratorio en el que se realizarán los análisis, la Comisión de Operación Sanitaria (COS) y CCAYAC. Éste, debe ser acordado entre las áreas de regulación y el Laboratorio. Cualquier modificación puede ser hecha si se realiza con antelación. (24 h)

Las muestras deben de estar debidamente identificadas con los siguientes datos:

- nombre del producto.
- nombre del verificador.
- área de cultivo.
- fecha y hora de muestreo o recolección.

4.1. TOMA Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

4.1.1. AGUA DE MAR

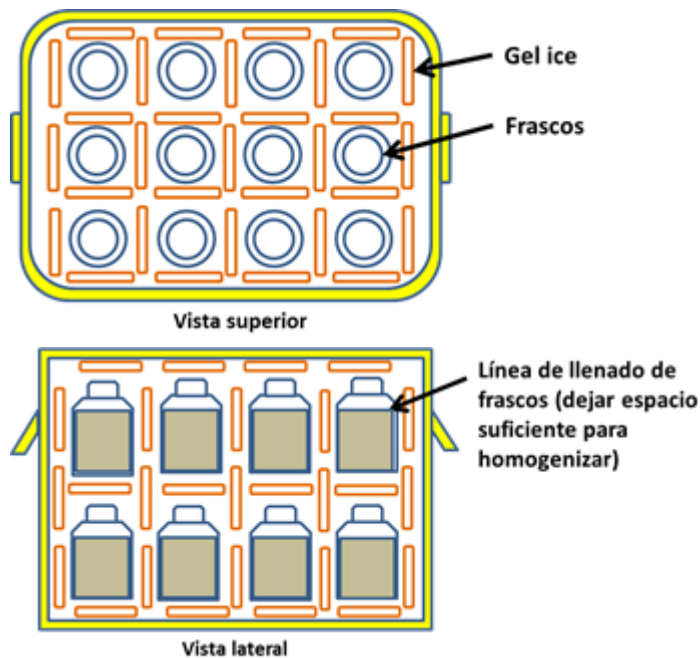
Las muestras de agua de mar para su análisis bacteriológico, deben tomarse en recipientes limpios y estériles. Una descripción de los recipientes adecuados y su preparación se encuentra en el punto [3.2.6](#) de este documento. Los frascos deben estar protegidos de la contaminación, durante y después de la recolección de la muestra.

Las muestras superficiales, pueden recolectarse sin ayuda de un dispositivo especial. Se debe mantener el recipiente sin abrir, hasta el momento inmediato de la toma. Durante el muestreo debe evitarse la contaminación de la tapa y la boca del recipiente, al tomar la muestra sostener el recipiente cerca de su base y sumergirlo con la boca del frasco hacia abajo. Girar el frasco ligeramente para que la boca quede hacia arriba durante el llenado, empujar el recipiente en forma horizontal hacia delante en dirección opuesta a la mano para evitar la contaminación. Para facilitar el homogeneizado en el Laboratorio, llenar los frascos hasta las $\frac{3}{4}$ partes de su volumen total. El tamaño de muestra por punto debe ser mayor a 110mL.

Al principio del muestreo, se debe tomar una muestra e identificarla como muestra testigo.

En cada punto de muestreo se debe realizar la determinación de temperatura y registrarla en la hoja de campo.

Las muestras deben transportarse en contenedores cerrados (hieleras) conteniendo gel-ice. Nunca debe usarse hielo. La disposición de las muestras y el gel-ice debe asegurar que todas las muestras se encuentran rodeadas por lo gel-ice (alternativamente pueden utilizarse hieleras eléctricas que aseguren que las muestras son transportadas en un ambiente de 8°C, Una vez que los contenedores han sido cerrados, no deben ser abiertos hasta su recepción en el Laboratorio. No es necesario hacer recambios del gel-ice, la cantidad de éstos debe ser suficiente para asegurar que las muestras llegarán con una temperatura por debajo de la temperatura de muestreo. Lo cual se logra cumpliendo con la siguiente disposición:



El análisis bacteriológico debe iniciarse inmediatamente después de la toma de la muestra; de preferencia dentro de la primera hora siguiente a su recolección. Las muestras deben transportarse en una hielera con gel-ice, hasta su análisis. En ningún caso, las muestras deben analizarse si se han almacenado por más de 30 h por lo que, cada Laboratorio, debe indicar el tiempo máximo a la recepción en el Laboratorio, considerando sus condiciones de operación, pero este debe ser menor a 26h, a menos que se justifique para áreas específicas el tiempo máximo de recepción de muestras, mismo que deberá estar establecido en el documento particular de criterios de recepción de muestras.

4.1.2. MOLUSCOS BIVALVOS PARA BIOTOXINAS MARINAS.

Las muestras se deben escoger de las especies de moluscos que son más propensos a revelar la presencia temprana de toxina y que son idóneos de mostrar los más altos niveles de toxinas (especies centinelas). Alternativamente, pueden utilizarse otras especies como indicadores de biotoxinas, en esos casos y cuando se tenga un resultado positivo por los métodos tamiz, se debe realizar el cierre precautorio del área para todas las especies de moluscos presentes en la misma. Si el resultado de la prueba tamiz es confirmado por el método de referencia y supera los límites regulatorios, entonces el área entrará en “veda precautoria”. Para volver a abrir el área, todas las especies deben ser analizadas usando el método de referencia y demostrar que están libres o por debajo de los límites regulatorios. Para que ocurra esta reapertura de las áreas vedadas se debe aplicar lo especificado en los lineamientos establecidos.

Las muestras deben transportarse en contenedores cerrados (hieleras) conteniendo gel-ice, en ningún momento se debe usar hielo. Una vez cerrados los contenedores, no deben ser abiertos hasta su recepción en el Laboratorio. No es necesario hacer recambios del gel-ice, la cantidad de éstos debe ser suficiente para asegurar que las muestras llegarán por debajo de la temperatura de muestreo.

El tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta su inicio de análisis no debe ser mayor a 24 h.

En el Cuadro 1 se describen las cantidades de muestra según la especie de molusco, para cada tipo de biotoxina, estos tamaños varían dependiendo de la productividad del producto, se debe asegurar la obtención de 150 a 250 g de carne para la determinación. Cuando se realicen todas las determinaciones, el tamaño máximo de muestras es de 60 piezas y el mínimo de 30.

Cuadro 1. Requisitos para el análisis de muestras de moluscos bivalvos.

Especie	Requisito	DSP		ASP	PSP	NSP
		HPLC-MM	PP2A			
Todas las especies, excepto panopea	Parte del organismo	Cuerpo completo				
	Número de piezas por determinación ³	12-30	12-30	12-30	12-30	12-30
Panopea	Parte del	masa visceral ²		masa	masa	Cuerpo

spp. ¹	organismo		visceral	visceral	completo
	Número de piezas ³	3	3	3	3

1.-De acuerdo con lo indicado por la FDA para las exportaciones a Estados Unidos, por lo que aplica para el control de áreas listadas para la exportación a los EUA. Para la vigilancia nacional y la exportación a China se debe analizar el cuerpo completo.

2.-La masa visceral o *visceropallium*, es la región metabólica suave, no muscular del molusco. Contiene los órganos del cuerpo.

3.- Cuando se use el cuerpo completo, se debe considerar la productividad del molusco.

4.2. TRANSPORTE DE MUESTRAS

4.2.1. ENVÍO DE MUESTRAS A CCAYAC

Previo al envío de la muestra se debe notificar a CCAYAC, el número de guía, inmediatamente por mensaje de texto al chat de “contingencia PMSMB” y a la brevedad vía correo electrónico a los siguientes:

- caguzman@cofepris.gob.mx
- srodriguez@cofepris.gob.mx
- cgalvez@cofepris.gob.mx
- mcastilloc@cofepris.gob.mx
- irguzman@cofepris.gob.mx
- pmsmb.ccayac@gmail.com

4.2.1.1. ENVÍO POR PAQUETERÍA:

- Todas las muestras deberán enviarse a nombre de: Ismael Escamilla, Alejandro Huerta, Sergio Rodriguez, Gilberto Marquez Cruz, Marco Antonio Ramírez Reséndiz
- Incluir el oficio de solicitud.
- Debe garantizarse la entrega en el horario de 8:00 a 17:00 hrs de lunes a jueves.
- Cualquier modificación puede ser hecha si se realiza con antelación (24 h).

4.2.1.2. ENVÍO PARA SER RECOGIDAS EN EL AEROPUERTO:

Se debe considerar que las muestras serán recogidas en los siguientes horarios.

- 7 hrs
- 11 hrs
- 15 hrs

Todas las muestras deberán enviarse a nombre de: Ismael Escamilla, Alejandro Huerta, Sergio Rodriguez, Gilberto Marquez Cruz, Marco Antonio Ramírez Reséndiz.

Incluir el oficio de solicitud

Cualquier modificación puede ser hecha si se realiza con antelación. (24 h)
Los análisis deben realizarse inmediatamente después de la recepción de la muestra.

Los resultados deben notificarse de manera oficial antes de 12h después de la recepción de la muestra para el caso de los métodos rápidos de biotoxinas y 24h para los métodos convencionales de biotoxinas y 76h para los análisis microbiológicos de agua de mar.

4.2.2. ENVÍO-RECEPCIÓN DE MUESTRAS EN LOS LESP

El envío de las muestras debe ser acordado entre el usuario y el Laboratorio. Pueden recibirse muestras en el Laboratorio siempre que se garantice la entrega en el horario hábil de Laboratorio preferentemente de lunes a miércoles. Cualquier modificación puede ser hecha si se realiza con antelación. (24 h) Los análisis de biotoxinas deben realizarse inmediatamente después de la recepción de las muestras. Los resultados por métodos rápidos para biotoxinas deberán notificarse de modo oficial antes de 12h después de la recepción de la muestra.

La notificación de los informes de resultados debe realizarse al área de regulación del estado, la COS y la CCAYAC.

En casos justificados (por ejemplo cuando la muestra se reciba después del horario de recepción) los informes pueden reportarse hasta antes de las 9 h del día siguiente.

Cuando un resultado es positivo se debe notificar inmediatamente (por el jefe del área) vía correo a los siguientes contactos y en “chat de contingencias”

- Área de regulación del estado
- COS
- CCAYAC.

4.2.3. ENVÍO DE EXTRACTO PARA CONFIRMACIÓN A CCAYAC.

Los Laboratorios autorizados para el análisis de biotoxinas por métodos rápidos o tamiz, deben notificar sus programa de recepción de muestras a la CCAYAC.

De acuerdo a lo establecido en el plan de contingencia de biotoxinas cuando hay un resultado positivo, se debe notificar de inmediato la siguiente información:

- Tipo de biotoxina de que se trata
- Área en cuestión
- Número de guía con la cual, son enviadas y
- Cuando la extracción se realice en una masa diferente a la indicada en el método de prueba.

Dicha notificación debe realizarse inmediatamente utilizando siempre las siguientes vías:

1. Vía el chat “contingencia PMSMB”
2. Vía correo electrónico
 - A. caguzman@cofepris.gob.mx
 - B. srodriguez@cofepris.gob.mx
 - C. cgalvez@cofepris.gob.mx
 - D. mcastillo@cofepris.gob.mx
 - E. irguzman@cofepris.gob.mx
 - F. pmsmb.ccayac@gmail.com
 - G. controlanalitico@cofepris.gob.mx
 - H. psuarez@cofepris.gob.mx
 - I. garroyo@cofepris.gob.mx
 - J. lisanchez@cofepris.gob.mx
 - K. ampichardo@cofepris.gob.mx
 - L. mstone@cofepris.gob.mx
 - M. mcastillo@cofepris.gob.mx

Los extractos y las muestras deben de estar debidamente identificadas con los siguientes datos:

- nombre del producto.
- nombre del verificador.
- área de cultivo.
- fecha y hora de muestreo o recolección.

Las muestras deben recibirse en hieleras de plástico o unicel, acompañadas de refrigerantes (gel ice). La temperatura de recepción debe ser menor a la temperatura de muestreo. Para PSP el tiempo transcurrido desde su recepción en la CCAYAC hasta la emisión del informe de resultados, debe ser menor a las 24h.

4.3. CRITERIOS DE RECEPCIÓN

Las muestras deben ser recibidas dentro del programa aprobado.¹

Las muestras y los extractos deben de estar debidamente identificadas con los siguientes datos:

- Nombre del producto
- Nombre de quien toma la muestra
- Área de cultivo y punto de muestreo
- Fecha y hora de muestreo o recolección

Las muestras deben acompañarse por:

- Oficio de solicitud de análisis, donde se especifica el área de muestreo, el tipo de muestreo (vigilancia nacional, exportación), el tipo de muestras (molusco, agua) y los datos para el envío de resultados.
- Hoja de Campo, donde se describen los datos relevantes como: temperatura de muestreo, tipo de muestra, área de cultivo, análisis solicitado, fecha y hora de monitoreo y nombre del verificador. El registro de las fechas debe hacerse considerando el siguiente formato DD/MMM/AA.

4.3.1. RECEPCIÓN DE MUESTRAS DE AGUA DE MAR

Los frascos de muestreo, deben ser de plástico resistente a la esterilización por autoclave, con un volumen suficiente para contener por lo menos 110mL en las $\frac{3}{4}$ partes del frasco de muestra de agua de mar y permitir contar con un espacio adecuado (2.5 cm) para permitir la homogeneización de la muestra en el Laboratorio. Los recipientes deben estar limpios, estériles, con cierre hermético, y apropiadamente etiquetados o identificados individualmente; Se debe verificar que los datos de los frascos de muestreo coinciden con los plasmados en la solicitud de análisis y la hoja de campo (Área de cosecha, Fecha y hora de toma, Verificador, Zona o clave de muestra).

¹ El programa debe hacerse de conocimiento de la CCAYAC, por lo que deberá ser enviado al correo pmsmb.ccayac@gmail.com
MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, 2016.

Las muestras deben acompañarse de una muestra testigo, la cual debe tomarse al inicio del muestreo en la primera estación de muestreo, la hoja de campo debe registrar la toma de muestra y la temperatura en el momento del muestreo. Después del monitoreo, las muestras deben transportarse en una hielera con refrigerantes (gel ice) hasta su análisis, nunca usar hielo. La distribución de las muestras y el refrigerante debe permitir que todas las muestras estén expuestas a la temperatura de transportación en condiciones semejantes. Estas muestras deben entregarse lo más pronto posible al Laboratorio; evitar retrasos así como, traspasar la muestra a nuevos contenedores o cambiar los refrigerantes o cualquier otra actividad que demore la entrega o modifique las condiciones iniciales de monitoreo.

En el Laboratorio, se debe medir y registrar la temperatura de la muestra testigo al momento de su recepción y verificar que es menor a la temperatura que tenía el agua de mar al momento del monitoreo. También debe verificarse por observación, que todas las muestras fueron transportadas en igualdad de condiciones. (ver diagrama) El caso contrario es motivo de rechazo.

El análisis de las muestras debe iniciarse tan pronto como sea posible después de su toma. El tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta su análisis no debe ser mayor a 24 h. Para áreas específicas, se puede definir un tiempo máximo de entrega el cual nunca deberá ser mayor a 26 h.

Los laboratorios deben mantener registros del rechazo de muestras y el correspondiente análisis de causas, y su correspondiente, plan de acciones.

4.3.2. RECEPCIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS

4.3.2.1. MOLUSCOS BIVALVOS VIVOS

Los moluscos bivalvos vivos deben transportarse en contenedores limpios, impermeables y que eviten rupturas. Por ejemplo pueden utilizarse bolsas de papel a prueba de agua, vasos de cartón parafinados o bolsas de plástico.

La cantidad de piezas debe ser la indicada de acuerdo con la especie de la que se trate ([cuadro 2](#)) en general se requiere un mínimo de 12 moluscos los cuales deben tomarse considerando que la muestra debe ser representativa y la posibilidad de escoger muestras para el mayor desconchado. Con la mayoría de las especies, se obtendrán aproximadamente 200g de carne y licor.

Para algunas especies como **Pacific oyster**, *Crassostrea gigas* y *Macra solidissima* debido a su tamaño podrían **producir** más de 200g de licor y carne, sin embargo es necesario que se usen al menos 12 animales por especie.

Por otro lado para otras especies pequeñas como *Olympia oyster*, *Ostrea lurida* *Protothaca staminea* y *Tapes japonica*, pueden obtenerse menos de 100g, para esas especies será necesario proporcionar más piezas al Laboratorio.

Las muestras de moluscos bivalvos deben mantener las valvas cerradas, deben estar etiquetadas con el nombre del verificador, tipo de molusco, el área de cosecha, fecha; así como la hora de inicio y término del muestreo del lugar de la toma.

Inmediatamente después de su recolección, los moluscos deben almacenarse en hieleras en condiciones entre 0°C y 10°C hasta su entrega en el Laboratorio. Punto crítico.

El análisis de las muestras debe iniciarse tan pronto como sea posible después de su toma. Debido a la necesidad de tomar acciones sanitarias, las muestras deben **ser analizadas antes de 24 h**. Este es un punto crítico.

4.3.2.2. MOLUSCOS BIVALVOS DESCONCHADOS

A sterile wide mouth container of sufficient capacity with watertight closure is an acceptable container for samples of shucked shellfish taken in shucking houses, repacking establishments or bulk shipments in the market. The shellfish may be transferred to the sample jar with sterile forceps or spoon. Samples of the final product of shucking houses or re-packing establishments may be taken in the final packing cans or containers. . The comments pertaining to species of various sizes in the section on shell stock applies to shucked shellfish Consumer-size packages are acceptable for examination, provided that they contain an adequate number of animals.

Samples of shucked shellfish shall be refrigerated immediately after collection by packing in crushed ice and they shall be so kept until examined.

4.3.2.3. MOLUSCOS BIVALVOS DESCONCHADOS CONGELADOS

Si el paquete contiene un número suficiente de organismos (10 a 12), uno o dos paquetes deben tomarse como muestra. Se pueden tomar muestras de bloques grandes, perforando con un instrumento apropiado o cortando en pedazos, utilizando técnicas asépticas. Las muestras deben colocarse en recipientes estériles de boca ancha para su transportación al Laboratorio.

Es deseable mantener las muestras de los moluscos desconchados congelados en congelación, a temperaturas cercanas a aquellas a las cuales fue tomada. Cuando esto no sea posible, las muestras congeladas deben empacarse con hielo molido y mantenerse así hasta su análisis.

5. ANÁLISIS DE AGUA DE MAR Y MOLUSCOS BIVALVOS

5.1. PREPARACIÓN DE MOLUSCOS BIVALVOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.

5.1.1. DESCONCHE

Antes de comenzar a remover el contenido de las conchas, las manos del analista debe lavarse profundamente con agua y jabón y enjuagarse con una solución de alcohol al 70%.

5.1.2. LIMPIEZA DE LAS CONCHAS

Remueva material orgánico, desprenda el exceso de material de la concha y utilizando un cepillo estéril, cepille bajo una corriente de agua de calidad potable poniendo particular atención en las hendiduras de las conchas y las uniones de las conchas. Coloque las conchas limpias en un recipiente limpio o en una toalla limpia y permita escurrir el exceso de agua.

5.1.3. EXTRACCIÓN DEL CONTENIDO

Antes de comenzar a remover el contenido de las conchas, las manos del analista deben lavarse profundamente con agua y jabón y enjuagarse con una solución de alcohol al 70 %.

Abra los moluscos bivalvos como se indica a continuación, recolectando la cantidad apropiada de licor y carne en una licuadora estéril u otro recipiente estéril apropiado.

Partiendo de una muestra representativa de mínimo 12 piezas obtener por lo menos 200g de muestra, o al menos una cantidad suficiente para cubrir las aspas de la licuadora

Para la dilución de las muestrras se debe usar buffer de fosfatos y licuar en una licuadora a alta velocidad por 60 a 120 segundos hasta alcanzar homogeneidad.

5.1.3.1. OSTIÓN

Sostenga la concha con las manos o sobre una toalla de papel limpia con la parte profunda de la concha sobre la mesa. Utilizando un desconchador estéril, inserte en el punto entre la concha y el lado ventral (a la derecha cuando la bisagra apunta al lado contrario del analista), cerca de $\frac{1}{4}$ de la distancia de la bisagra al cabo. La apertura también puede hacerse por el cabo y después hacer una pequeña incisión con un instrumento estéril similar a las pinzas de cortar hueso.

Corte el músculo abductor de la parte plana superior de la concha y abra la concha lo suficiente para drenar el licor a un vaso de precipitados tarado estéril, recipiente o vaso de licuadora de boca ancha. La concha superior puede entonces ser aflojada por la bisagra, descartada y la carne colocada en un vaso de precipitados o recipiente después de romper el músculo adherido a la concha inferior del molusco.

Durante el desconche se debe tener precaución en la manipulación de la concha y el desconchador todos los movimientos deben realizarse hacia a fuera del cuerpo del analista.

5.1.3.2. ALMEJA DURA

Para penetrar una almeja dura, *Mercenaria mercenaria* o almeja de cuello corto del pacífico, se utiliza un cuchillo de hoja delgada estéril similar a un cuchillo mondador. Para abrir la almeja, sostenga en la mano, coloque la punta del cuchillo en las uniones y fuerce la concha con presión. Un método alternativo es hacer una pequeña punción en el cabo con unas pinzas estériles y con el cuchillo corte los 2 músculos abductores.

Drene el licor de la concha dentro de un recipiente para muestras. Corte el músculo abductor de las conchas y pase el cuerpo del animal al interior del recipiente.

5.1.3.3. ALMEJAS.

La almeja blanda, *Mya arenaria*, la almeja mantequilla del Pacífico, *Saxidomus giganteus*, la almeja surf, *Macra solidissima* y especies similares, pueden desconcharse con un desconchador estéril, abriendo por el cabo del sifón y corte el músculo abductor primero de la valva superior y posteriormente de la valva inferior.

5.1.3.4. MEJILLONES.

Mejillones, Volsella y especies de *Mytilus*, pueden abrirse por la bisagra. Se debe remover el hilo byssal durante el lavado de la concha. El cuchillo puede ser introducido y las conchas moverlas a un lado con un

movimiento de torsión, permitiendo el drenado del licor de la concha. Corte todas las porciones adheridas a la concha.

5.1.3.5. MOLUSCOS BIVALVOS DESCONCHADOS.

Pase una cantidad suficiente de muestra del recipiente con la muestra a un vaso de licuadora estéril tarado u otro contenedor, usando una cuchara estéril.

5.1.4. DILUCIÓN Y HOMOGENEIZADO.

Pese la muestra lo más cercana al gramo. Use 10 – 12 moluscos bivalvos, para obtener 200 g de licor y carne. Coloque la muestra pesada en una licuadora estéril y agregue igual cantidad, por peso, de solución amortiguadora de fosfatos (recomendada) o agua peptonada estéril al 0.5 %. Una dilución de cantidades iguales por peso del desconchado de ciertas especies de moluscos bivalvos resulta, después del homogeneizado, en una mezcla espesa que dificulta el pipeteo. La carne de la almeja dura, surf y la almeja mantequilla con frecuencia presenta esta característica. Inocule estas especies sin diluir a los tubos. En estos casos puede permitirse el uso de porciones mayores. Se sugiere mezclar 3 partes de la solución diluyente por 1 de la muestra. Con tales diluciones, 4 mL de la muestra homogeneizada debería ser igual a 1g de molusco bivalvo y así usarse en el procedimiento de inoculación.

Homogenice por 60 – 120 segundos en una licuadora de laboratorio aproximadamente a 14000rpm. El óptimo homogeneizado dentro de este intervalo variará con el tipo de máquina utilizada, la especie de moluscos bivalvo y probablemente el estado físico de la carne. En general, un tiempo de homogeneizado de 60 – 90 segundos va a ser óptimo para la mayoría de las especies. En recipientes pequeños debe evitarse el homogeneizado excesivo con el fin de prevenir sobrecalentamiento.

5.2. DILUCIÓN Y MOLIENDA PARA BIOTOXINAS MARINAS

5.2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

5.2.1.1. ALMEJAS, OSTRAS Y MEJILLONES:

Limpia a fondo el exterior de los moluscos con agua corriente. Abrir cortando músculos aductores. Enjuague el interior con agua dulce para eliminar la arena u otro material extraño. Retire la carne de la concha separando los músculos aductores y el tejido de conexión en la articulación. No utilice calor o anestésicos antes de la apertura de la concha, debe tenerse particular cuidado de no lastimar o cortar el cuerpo del molusco. Recoger entre 100 - 150 g de carne un tamiz N ° 10, sin capas, y dejar escurrir durante 5 minutos. Seleccionar piezas. Moler en una licuadora hasta homogénea.

Vieiras: porción comestible separada (músculo aductor) aplicar la prueba solo a esta parte. Escurrir y triturar como se ha mencionado antes.

Moluscos en conserva: verter todo el contenido del frasco (la carne y los líquidos) en la licuadora y mezclar hasta que esté homogéneo.

5.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

En el [cuadro 2](#) se relaciona el listado de métodos tamiz y métodos convencionales que aplican en apoyo al PMSMB y al NSSP.

Siempre que se obtenga un resultado positivo por prueba tamiz o se supere el nivel de aceptación, deberá ser confirmado por un método de Referencia, por lo que deberá enviarse el extracto y la molienda del molusco a CCAYAC, para la confirmación del resultado.

5.3.1. CUADRO 2. LISTADO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DEL PMSMB Y DEL NSSP Y LABORATORIOS RECONOCIDOS.

Sustancia	Tipo de producto recomendado	Método PMSMB	Método PMSMB/NSSP	Nivel de aceptación	Laboratorios PMSMB	Laboratorios PMSMB/NSSP
-----------	------------------------------	--------------	-------------------	---------------------	--------------------	-------------------------

Sustancia	Tipo de producto recomendado	Método PMSMB	Método PMSMB/NSSP	Nivel de aceptación	Laboratorios PMSMB	Laboratorios PMSMB/NSSP
Toxina paralizante (PSP)	Mejillón	<p>Método Tamiz: SRT-PSP CCAYAC-M-322 Scotia Rapid Tests for PSP</p>		Negativo	<p>LESP Baja California LESP Baja California Sur ANDA LESP Sonora LESP Sinaloa LESP Nayarit LESP Veracruz <u>LESP Tamaulipas</u></p>	<p>LESP Baja California LESP Baja California Sur <u>LESP Sonora</u></p>
		<p>Método de Referencia: NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. B.3. BIOENSAYO PARA TOXINA PARALIZANTE EN MOLUSCOS BIVALVOS.</p>	<p>Método de Referencia: Bioensayo (MBA) CCAYAC-M-005² Recommended procedures for examination of seawater and shellfish</p>	<p>800 µg/kg o 80 µg/100g</p>	<p>CCAYAC</p>	<p>CCAYAC <u>LESP Baja California**</u></p>

² La verificación del factor de conversión debe hacerse periódicamente como sigue: si los moluscos son analizados menos de una vez a la semana, determinar el valor del FC cada día que el ensayo sea realizado. Si los ensayos se realizan durante varios días a la semana, verificar solamente una vez por semana. Solo para los laboratorios que hayan demostrado históricamente una consistencia estadística aprobada por CCAYAC, podrán reducir la frecuencia de verificación.

Sustancia	Tipo de producto recomendado	Método PMSMB	Método PMSMB/NSSP	Nivel de aceptación	Laboratorios PMSMB	Laboratorios PMSMB/NSSP
Toxina Amnésica (ASP)	Ostión, Mejillón, Almeja	Método Tamiz: SRT-ASP CCAYAC-M-324 Scotia Rapid Tests for ASP1		Negativo	LESP Baja California LESP Baja California Sur ANDA LESP Sonora LESP Sinaloa LESP Nayarit LESP Tabasco LESP Veracruz	LESP Baja California LESP Baja California Sur <u>LESP Sonora</u>
		Método de Referencia: NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. B.4. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO DOMOICO POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (HPLC)	Método de Referencia: HPLC/UV CCAYAC-M-001 Método modificado: John Wekell, Michael Quilliam, y James Hungerford, Domoic Acid in Unsaltes Fresh or Frozen Shellfish Methanol-Water Extraction LC Method. Evaluación del Oficial de FDA Chandler, Linda A en mayo 2005	20mg/Kg	CCAYAC	CCAYAC

Sustancia	Tipo de producto recomendado	Método PMSMB	Método PMSMB/NSSP	Nivel de aceptación	Laboratorios PMSMB	Laboratorios PMSMB/NSSP
Toxina Diarreica (DSP)	Ostión, Mejillón, Almeja	<p>Método de referencia: PP2A Phosphatase CCAYAC-M-323 Abraxis PP2A</p>		< 160 meqOA/kg	<p>LESP Baja California LESP Baja California Sur LESP Sinaloa LESP Sonora LESP Veracruz LESP Nayarit LESP Tamaulipas</p>	<p>LESP Baja California LESP Baja California Sur LESP Sonora</p>
		<p>Método de Referencia: HPLC- MM CCAYAC-M-334 UE Harmonized</p>			<p>CCAYAC</p>	<p>CCAYAC</p>
Brevitoxina (NSP)	Ostión, Mejillón, Almeja	<p>Método de Referencia: CCAYAC-M-301/1 Recommended Procedures for the Examination of sea water and Shellfish. 4ta. Ed. 1970. Part. V Bioassay for Shellfish Toxins. APHA.</p>	No aplica	20 UR /100 g	CCAYAC	No aplica

** En implementación

5.3.2. MICROBIOLÓGICO EN AGUA DE MAR

Análisis de Agua de mar	Método PMSMB	Método PMSMB / NSSP	Laboratorios PMSMB	Laboratorios PMSMB/NSSP
Coliformes Fecales	NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. B.17. De la estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable. Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> por la técnica de diluciones en tubo múltiple.	CCAYAC-M-344 Método de prueba para el análisis microbiológico de agua de mar de áreas de cultivo de moluscos bivalvos	LESP Baja California LESP Baja California Sur ANDA LESP Sonora LESP Sinaloa	LESP Baja California LESP Baja California Sur LESP Sonora
Coliformes Fecales de plantas de tratamiento con UV	Total Coliform Other Multiple Tube Fermentation Methods. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environmental Federation. 1992. Section 9221. Examination of a 100 ml aliquot by the Multiple Tube Fermentation Method (MTF). Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition, APHA/AWWA/WEF. Washington, D.C	CCAYAC-M-354/0 Método de Prueba para el análisis microbiológico de agua de mar tratada con UV	LESP Baja California	LESP Baja California

5.3.3. MICROBIOLÓGICO EN PRODUCTO.

Análisis Microbiológico de producto.	Método PMSMB	Método PMSMB / NSSP	Laboratorios PMSMB	Laboratorios PMSMB/NSSP
<i>V. parahaemolyticus</i> . ³	Método de prueba para la cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> toxigénico tdh y trh por NMP y PCR en tiempo real en muestras de moluscos bivalvos. CCAYAC-M-342		En implementación	<u>LESP BC</u>

³ [Conforme a lo indicado en la Evaluación de Riesgo y Plan de Control de *Vibrio parahaemolyticus* para ostiones que se exportan a los EE.UU.](#)

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, 2016.

Análisis Microbiológico de producto.	Método PMSMB	Método PMSMB / NSSP	Laboratorios PMSMB	Laboratorios PMSMB/NSSP
Salmonella	NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. B.14 Método para la determinación de <i>Salmonella spp.</i> en alimentos.		Ver listado de laboratorios terceros autorizados , se deroga el 17 de diciembre de 2016.	No aplica
	NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice Normativo A. Método de referencia para el aislamiento de <i>Salmonella spp.</i>		Entrará en vigor a partir del 17 de diciembre de 2016.	No aplica
<i>V. cholerae</i>	NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. B.19. Técnicas y procedimientos para la investigación de <i>Vibrio cholerae</i>		Ver listado de laboratorios terceros autorizados.	No aplica
<i>E. coli</i>	NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Apéndice normativo B. Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable. Determinación de bacterias coliformes, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i> por la técnica de diluciones en tubo múltiple.		Ver listado de laboratorios terceros autorizados. En vigor hasta el 17 de septiembre de 2016.	No aplica
	Apéndice H Normativo. Método aprobado para la estimación de la densidad de Coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.		Entrará en vigor a partir del 18 de septiembre 2016.	No aplica

Fecha de actualización: 11 de noviembre de 2015

5.4. INFORME DE RESULTADOS

El resultado debe enviarse de manera inmediata al cliente (solicitante del análisis) a través de correo electrónico o alguno otro medio que facilite la recepción de datos.

Para las áreas que exportan productos a los Estados Unidos, únicamente los [Laboratorios aprobados](#) para este propósito pueden generar resultados.

El informe de resultados debe estar compuesto por los siguientes documentos, oficio de solicitud (cuando aplique), hoja de campo, hoja de trabajo analítico, cuando el sistema de gestión de calidad de cada Laboratorio lo requiera se anexan los informes de resultados, los cuales deberán contener la siguiente información:

- Área de cosecha,
- Fecha y hora de inicio de muestreo,
- Número de muestras,
- Hora de inicio de muestreo,
- Temperatura de inicio de muestreo,
- Fecha y hora de término de muestreo,
- Fecha y hora de recepción de muestras a CCAYAC,
- Pruebas realizadas,
- Método empleado,
- Especificación,
- Resultado obtenido,
- Comentarios de la muestra (cuando aplique),
- Tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta la recepción de la muestra.
- Tiempo transcurrido desde la toma de la muestra hasta la emisión del informe de resultados.

Todos los informes de resultados deben ser copiados a los siguientes funcionarios de COFEPRIS:

- Álvaro Israel Pérez Vega, Comisionado de Operación Sanitaria aiperez@cofepris.gob.mx
- Imelda Rocío Guzmán Cervantes, Directora Ejecutiva de Control Analítico irguzman@cofepris.gob.mx
- Aldo Heladio Verver y Vargas Duarte, Director Ejecutivo de Programas Especiales aververyvargas@cofepris.gob.mx
- Jose Alejandro Barreiro Isabel, Coordinador del PMSMB jabarreiro@cofepris.gob.mx
- Mario Castillo Chávez mcastilloc@cofepris.gob.mx
- Luis Ignacio Sánchez Córdoba lisanchez@cofepris.gob.mx
- César Omar Gálvez González, Coordinador de Proyectos Analíticos cgalvez@cofepris.gob.mx

- Coordinación de laboratorios pmsmb.ccayac@gmail.com
- Control analítico controlanalitico@cofepris.gob.mx

6. BIBLIOGRAFÍA

Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish. Fourth Edition 1970. American Public Health Association. 1740 New York, N.Y. 10019.

Método modificado: John Wekell, Michael Quilliam, y James Hungerford, *Domoic Acid in Unsaltes Fresh or Frozen Shellfish Methanol-Water Extraction LC Method.*

Evaluación del Oficial de FDA Chandler, Linda A. mayo 2005. La última evaluación por las Oficiales de FDA Chandler, Linda A y Melissa Evans fue en mayo de 2013, como se presenta en la versión CCAYAC-M-001/10

Most Probable Number, Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, 2001 revision. Chapter 9, Section D.2. a trough d. [http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html]

Identification of Vibrio vulnificus by DNA probe. Wright, A.C. et al. 1993. Rapid identification of Vibrio vulnificus on nonselective media with an alkaline phosphatasa-labeled oligonucleotide probe. Appl. Environ. Micro. 59:541-546.

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods Vibrio, Chapter 40 Kaysner, C.A. & A. De Paola. 2001., In., 4th edition, F.R. Downer & K. Ito, Edts., American Public Health Association, Washington, D.C.

Asociación Americana de Salud Pública. 1985. Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 16a Ed. *American Public Health Association, American Water Works Association, Agua Federación de Control de la Contaminación. Washington DC.*

Food and Drugs Adminsitration. 1994. Procedimientos normalizados para o Moluscos (Laboratorio de Evaluación del Estado Oficiales. Administración de Alimentos y Drogas, Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada de la Oficina de Programas de Campo de la División de Programas Cooperativos, Rama Seguridad mariscos (idem), Washington, DC

Manual of Clinical Microbiology Balows, A., W.J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H.D. Isenberg and H. J. Shadomy, editor. 1991., 5th edition. American Society of Microbiology, Washington, D.C.

NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.



National Shellfish Sanitation Program (NSSP) Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2013 Revision

US Harmonized Standard Operating, Procedure for detection of Lipophilic, toxins by Mouse Bioassay

http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/COMISIÓN%20DE%20OPERACIÓN%20SANITARIA_Documentos%20para%20publicar%20en%20la%20sección%20de%20MEDICAMENTOS/MB%20y%20PP/VpPlan.pdf

Guías de evaluación FDA mayo 2016.

Informe de auditoría CFIA marzo 2016



MINISTRY OF HEALTH

**FEDERAL COMMISSION FOR THE PROTECTION AGAINST
SANITARY RISKS**

**COMMISSION FOR ANALYTICAL CONTROL AND EXTENSION
OF COVERAGE**

MEXICAN SHELLFISH SANITATION PROGRAM

**LABORATORY GUIDE FOR THE ANALYSIS OF SEA WATER
AND SHELLFISH**

Mexico, 2016



MINISTER OF HEALTH

José Narro Robles

FEDERAL COMMISSIONER FOR THE PROTECTION AGAINST SANITARY RISKS

Julio Sánchez y Tepoz

COMMISSIONER FOR ANALYTICAL CONTROL AND EXTENSION OF COVERAGE

Armida Zúñiga Estrada

EXECUTIVE DIRECTOR OF ANALYTICAL CONTROL

Imelda Rocío Guzmán Cervantes

EXECUTIVE DIRECTOR OF INNOVATION

Josefina Gutiérrez Ramírez

MSSP TECHNICAL COMMITTEE OF LABORATORIES

LESP Baja California

Esperanza Romo Rodríguez

Ramona Padilla Salas

LESP Baja California Sur

Karla Verónica Lucero Savin

Jorge Paul Castro Cosío

LESP Sonora

Candia Plata

Alma Encinas

CCAYAC / COFEPRIS

Arturo Vargas Tapia Prandiz

Gabriela Muciño Brito

César Omar Gálvez González

INDEX

1. GENERAL ASPECTS	58
1.1. OBJECTIVE	58
1.2. THE LABORATORIES AND THE MSSP	58
1.3. THE QUALITY ASSURANCE SYSTEM IN THE LABORATORIES PARTICIPATING IN THE MSSP	59
2. ASSESSMENT OF THE LABORATORIES OF THE MSSP	60
2.1. THE LABORATORIES THAT SUPPORT THE MSSP AND the assessment BY THE FDA FOR their PARTICIPATION IN THE NSSP	60
2.2. EVALUATORS	60
2.2.1. EVALUATOR RESPONSIBILITIES WITH THE FDA.....	61
2.2.2. MAINTENANCE OF THE RECOGNITION OF THE EVALUATOR RECOGNIZED BY THE FDA	61
3. REQUIREMENTS FOR OPERATION OF THE LABORATORIES	62
3.1. EQUIPMENT	62
3.1.1. INCUBATORS	62
3.1.2. THERMOMETERS	63
3.1.3. OVENS	64
3.1.4. aUTOCLAVES	65
3.1.5. pH meter and electrode	65
3.1.6. Balances.....	66
3.1.7. SPECTROPHOTOMETER (READER PLATE).....	67
3.1.8. pIPETTES.....	68
3.1.9. MECHANICAL OR ELECTRONIC MICROPIPETTES	69
3.1.10. WATER BATHS.....	70

3.2. MATERIALS	71
3.2.1. Utensils for preparation of culture media	71
3.2.2. Durham TUBES	71
3.2.3. Pipette canisters	71
3.2.4. Bottle FOR dilution or tubes.....	71
3.2.5. Fermentation Tubes.....	71
3.2.6. SamPLING Bcontainers	72
3.3. WASHING AND STERILIZATION	72
3.3.1. washing	72
3.3.2. STERILIZATION	72
3.4. WATER	73
3.5. CULTURE MEDIA.....	73
3.5.1. PREPARATION OF CULTURE MEDIA.....	73
3.5.2. STORAGE OF CULTURE MEDIA.....	74
3.5.3. ADJUSTING pH.....	74
3.5.4. STERILIZATION.....	74
3.6. QUALITY CONTROL OF CULTURE MEDIA AND of the METHOD OF ANALYSIS FOR fecal coliforms	75
3.6.1. materials	75
3.6.2. Procedure for the positive control (<i>Escherichia coli</i>).....	75
3.6.3. Procedure for the negative control (<i>Enterobacter aerogenes</i>).....	75
4. collection, TRANSPORTation AND RECEPTION OF SEAWATER AND SHELLFISH SAMPLES FROM classified GROWING AREAS FOR LABORATORY analysis.....	76
4.1. sample TAKing AND TRANSPORT	76
4.1.1. seawater	76

4.1.2.	SHELLFISH for biotoxins.....	77
4.2.	TRANSPORTATION OF SAMPLES.....	78
4.2.1.	SENDING SAMPLES TO CCAYAC.....	78
4.2.1.1.	SENDING SAMPLES BY COURIER SERVICE:	79
4.2.3.	SENDING EXTRACT or samples to ccayac FOR CONFIRMATION.....	81
4.3.	SAMPLES RECEPTION CRITERIA.	82
4.3.1.	RECEPTION OF SEAWATER SAMPLES.....	82
4.3.2.	RECEPTION OF SHELLFISH	83
5.	microbiological ANALYSIS OF SHELLFISH	85
5.1.	PREPARATION OF THE Shellfish FOR ANALYSIS.....	85
5.1.1.	shucking process.....	85
5.1.2.	DILUTION AND grinding for microbiological test.....	86
5.2.	DILUTION AND GRINDING FOR BIOTOXINS.	86
5.3.	METHODS OF ANALYSIS	87
5.4.	REPORT OF RESULTS.....	92
6.	bibliography	94

Updated text in this document are highlighted with a line below the text.

1. GENERAL ASPECTS

1.1. OBJECTIVE

This document is intended to provide guidance to laboratories on meeting the technical requirements of the *Mexican Shellfish Sanitation Program* (MSSP), including the *National Shellfish Sanitation Program* (NSSP) that is supported by a memorandum of understanding (MOU) the between the Food and Drug Administration (FDA) and the Federal Commission for the Protection against Sanitary Risks (COFEPRIS).

These requirements apply to private and public laboratories that carry out analytical activities on samples of Shellfish and fishery products for domestic consumption and exportation to different countries. Program requirements are described in the technical guide of the MSSP.

1.2. THE LABORATORIES AND THE MSSP

The technical guide of the MSSP has as a fundamental principle to provide the guidelines for the international trade of Shellfish and fishery products, although these also apply within the Mexican United States in the compatible points, described in the NOM-242-SSA1-2013. *Products and services: Fishery products fresh, chilled, frozen and processed*. It is important to note that, for export purposes of these products, the agreements signed with each country or region of the world must be considered.

The laboratories that analyze the quality of the Shellfish and the sea water from the harvesting areas from where they are extracted are a key component of the MSSP and the NSSP. The bacteriological and toxicity results of water and product samples are widely used in the MSSP to support scientifically that the sanitary risk from the consumption of shellfish is within the levels of acceptance. The experience in the analysis of biotoxins in shellfish and microbiological quality of water from the harvesting areas indicates that a strict alignment with the established analytical methodologies must be kept and that this work must be supported in quality management and assurance systems, in order to guarantee the quality of the analytical results. Likewise, the conditions of the taking, handling and transportation of samples to the laboratory must be controlled.

:

Laboratories supporting the MSSP:

Laboratories recognized by COFEPRIS

These laboratories are Third Parties authorized (public or private) by COFEPRIS which also comply with the MSSP requirements described in this document and in the technical guide of the MSSP. They are supervised and audited by the Commission for Analytical Control and Extension of Coverage (CCAYAC) for this particular purpose. The results issued by these laboratories can be used for control purposes and national surveillance of the harvesting areas or the products extracted from them.

Laboratories recognized by the FDA-NSSP

These laboratories are Third Parties authorized (public or private) by COFEPRIS that, in addition to complying with the requirements and characteristics mentioned in the previous paragraph, are audited by technical experts from the FDA on the basis of the technical guide established for this purpose and, in case of demonstrating the strict alignment to it, they are called "In conformity with the guidelines of the FDA". These laboratories are the only ones which results can be used for control purposes and surveillance of the harvesting areas or the products extracted from them for export purposes of Shellfish to the United States of America.

The requirements for the assessment of laboratories that analyze samples for the MSSP are aligned with the requirements of Authorized Third Party test laboratories and with the guidelines of the NSSP. The list of such laboratories is available at the following link: [List of laboratories that support the MSSP/NSSP](#).

1.3. THE QUALITY ASSURANCE SYSTEM IN THE LABORATORIES PARTICIPATING IN THE MSSP

To ensure consistency in the performance of all the Laboratories that support the MSSP, it is necessary that the laboratories have a Quality Management System based on the standard NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025) which considers compliance with the following points in particular:

- The structure of the organization and management of the Laboratory.
- The programs applied to ensure that the Laboratory personnel, is qualified, trained and supervised.
- The procedures and methods for sample reception.
- The procedures and methods applied for taking, maintaining, transporting, and analyzing samples
- The Quality control measures, the frequency and tolerance limits to determine the operation of equipment.
- Maintained records on performance, quality control results, calibration and maintenance of equipment.
- Having a Quality Assurance System, in order to support the validity of analytical results. Such program requires a systematic application to eliminate or minimize the errors that can occur in any Laboratory operation caused by personnel, procedures, equipment, media, reagents, sampling and analytical method.
- Participate in a Proficiency Test Program for the External Assessment or Performance Assessment of the Laboratories, as part of the Quality Assurance Program.
- To receive technical evaluations performed by COFEPRIS and if applicable, by technical staff from FDA and sanitary authorities from other countries.
- To take corrective actions for any deficiency found in the Quality Assurance Program of the Laboratory.

2. ASSESSMENT OF THE LABORATORIES OF THE MSSP

2.1. THE LABORATORIES THAT SUPPORT THE MSSP AND THE ASSESSMENT BY THE FDA FOR THEIR PARTICIPATION IN THE NSSP

Any non-complying Laboratory or candidate to be a Laboratory recognized by the FDA as in compliance with the requirements of the NSSP, must be first an Authorized Third Party laboratory and secondly, a Laboratory in accordance with the requirements of the NSSP.

The audits performed to these Laboratories are carried out to keep, its validity as Authorized Third Party (see evaluation guide Authorized Third Parties) and secondly, the recognition from the FDA of compliance with the requirements of the NSSP through the use of the guide to evaluate the NSSP. It is important to highlight that the recognition as an Authorized Third Party Laboratory issued by COFEPRIS for the MSSP in product and sea water tests, does not mean that the laboratory complies with the NSSP. For this purpose, laboratories must complete satisfactorily the audit performed by the Laboratory Evaluation Officers (LEO) from the FDA Food and Drug Administration), which is managed by COFEPRIS under request of the producer State, only for the Laboratories authorized for methods and guidelines in the MSSP, and which have been evaluated by CCAYAC, providing evidence that they meet the specifications of the NSSP evaluation guide.

If the result of the FDA evaluation is satisfactory, the laboratory get the status of "in compliance" with the NSSP-FDA and the results can be used to export products based on the classification of areas and the surveillance of the biotoxins.

The system of assessment of laboratories is described in Chapter 3 of the technical guide of the MSSP.

2.2. EVALUATORS

The evaluators of the MSSP/NSSP are personnel recognized by the FDA for this specific purpose considering they have met the following criteria:

- The candidate must be part of a reference Laboratory (CCAYAC) or of the state Laboratories recognized by the FDA as being in compliance with the requirements of the NSSP. The evaluator may not evaluate his own Laboratory.
- The candidate must be an experienced analyst and must have experience as a supervisor or an auditor. The evaluators will have the responsibility to conduct frequent supervisions to the recognized laboratories to ensure compliance with the requirements of the NSSP or recommend when a laboratory can be evaluated by the FDA.
- Candidates must participate jointly with the LEO-FDA during the on-site evaluations of the laboratories and must demonstrate their competence in assessing the capacity of the laboratory to support the MSSP/NSSP.
- The evaluator must perform and document the assessment using the current version of the Guide for the assessment of Laboratories of the NSSP.

- The report of the evaluation must be done by the evaluation guide or/and a follow-up card, that shall describe: date of the finding, finding description, method involve, the point of the guide is not complied, the kind of the finding, corrective actions, the day and follow-up, of the actions and the effectiveness.
- The FDA will issue a communication informing the name of its technical liaisons responsible for the supervision of the Laboratories.

2.2.1. EVALUATOR RESPONSIBILITIES WITH THE FDA.

- Perform on-site audits for the Laboratories at least once a year.
- Follow-up of the corrective actions implemented by the laboratories. Using email (pmsmb.ccayac@gmail.com), teleconferences, videoconferences and the follow-up card, additionally, it is necessary to perform supervision visits to laboratories that are conditioned or when major changes to workloads or priorities have been made, when there has been a substantial staff turnover or at request made by the State authorities or leaders of the MSSP.
- Save copy of the evaluation guides filled.
- When were required, report to the LEO-USFDA the assessment results.
- Distribute assessment reports to the LEO-USFDA.
- Report the LEO-USFDA when a Laboratory has a “non-compliance” result on the assessment.
- Develop, coordinate and carry out the annual competence tests for all the Laboratories recognized by the MSSP and the NSSP.
- Keep an update list of the laboratories that support the program.

2.2.2. MAINTENANCE OF THE RECOGNITION OF THE EVALUATOR RECOGNIZED BY THE FDA

The evaluator must take into account the following criteria to maintain recognition:

- Remain as part of the reference Laboratory or the State Laboratories in compliance with the MSSP and the NSSP.
- Not to be the head (director) of any of the evaluated Laboratories.
- Be able to demonstrate continuous competence in the assessment of the capacity of the Laboratories that support the MSSP and the NSSP. It is useful to participate in joint evaluations with the LEO-FDA.
- Keep the file of the assessments of the laboratories and the results of their performance tests.

3. REQUIREMENTS FOR OPERATION OF THE LABORATORIES

3.1. EQUIPMENT

Users of the equipment and instruments shall demonstrate knowledge about the correct use of each equipment; users shall be authorized for use.

Laboratories shall have acceptance criteria of qualification and calibration services, allowing them to decide whether the instrument or equipment may remain in use or some action is required. These criteria must be based on those outlined in this manual or in its absence in the criteria published by CCAYAC, as indicated in the national or international reference standards.

3.1.1. INCUBATORS

EQUIPMENT

The incubators must maintain, throughout the time of use, a uniform and constant internal temperature in all the chamber where they are used. This can be achieved using water coated/jacketed or anhydrous models, with thermostat control for low temperatures, equipped with isolated electrical heating resistance and located on/close to the chamber walls and floors; preferably, they must be equipped with an air recirculation system (fan).

The incubators that have heating thermostats for high temperatures do not comply with these requirements due that their heat sources are inappropriately placed and frequently cause overheating and dryness of culture media, with the consequent failure in the growth of colonies.

QUALITY CONTROL

The temperature in the Laboratory, shall be maintained between 16 ° C - 27 ° C, unless the manufacturer indicates another condition.

Temperature inside the incubator for Fecal Coliform, shall be 35 °C ± 0.5 °C.

Temperature inside the incubator to determine Okadaic Acid shall be 30 °C ± 2 °C, when no automated plate reader ELISA incubation plates are used. When automatized plate incubator are used, it shall be qualified at this temperature.

When Large-Capacity incubators are used, at least two thermometers (one at the top and one at the bottom) must be used. The temperatures must be recorded twice a day (one in the morning and another in the afternoon). Do not take readings during or immediately after excessive openings of the door. Allow the incubator to recover its normal temperature after closing the door, for a reasonable time. Equipment for automated temperature recording can also be used, but its precision must be determined weekly by comparing its readings with the thermometer used in the incubator and record the results.

The incubators must be equipped with separate shelves to ensure uniformity of temperature throughout the chamber. There must be a space of 2.5 cm, between the material to be incubated and the walls of the chamber as well as, between the same materials.

For Petri dishes, it is not appropriate to stack more than four .

3.1.2. THERMOMETERS

The thermometers must be placed in the most representative places of the incubator, recording the temperature readings at least twice a day with an interval of not less than 4 hours between one reading (morning) and the other (afternoon).

For microbiological methods: total immersion mercury in glass thermometers (ASTM-64C) or non-mercury in glass thermometers (ASTM-S64C) must be used as reference thermometers as described in the criteria for calibration or verification below.

Reference thermometers (mercury/glass or non-mercury/glass), must be graduated in increments of 0.1 °C, in the interval from 25°C to 55°C and must have an auxiliary scale at 0 °C, shall be 379 mm in length. Reference thermometers must be calibrated by an accredited laboratory that uses a primary standard traceable to the National Metrology Center of Mexico (CENAM for its acronym in Spanish) or to the NIST. The calibration report must describe this information. Calibration must be done in the beginning of use and annually check ice point, any change in the ice point value represent a change in the same order in all the mercury column and it shall be consider in calculations.

Total immersion mercury in glass thermometers (ASTM-64C) or non-mercury in glass thermometers (ASTM-S64C) must be used as working thermometers as described in the criteria for calibration or verification below.

Working thermometers must be placed in clear acrylic tubes, with a diameter < 2 cm, taking care that the bulb is suspended and does not touch the tube bottom. The purpose of placing thermometers inside this tube is to fill it with a media that can properly distribute the temperature; for this case water is used which will cover the thermometers until 6-12 mm below the reading temperature. The thermometers must be kept in an upright position and perform the reading of the temperature vertically. Before the reading, the water level must be verified, which must be between 6-12 mm, otherwise it must be corrected.

Thermometers shall be stored lightly inclined, never horizontal.

In the following link there is a video available with the Information to prepare the tube of the thermometer.

Working thermometers for fecal coliform must be verified annually at the temperature of use (in example 35.0 °C, 44.5 °C) against the standard/reference thermometer, including the freezing temperature (0 °C). This must be done by placing both thermometers in a bath or calibration block fluke or equivalent.

CRITERIA FOR CALIBRATION OR VERIFICATION

- Working thermometers used at 44.5 °C must be verified by comparison against a reference thermometer, the difference in the readings must be ± 0.1 °C; for the freezing point (0 °C) it must be ± 0.0 °C. When there is non-compliance with this criterion, the thermometer must be removed or be used for any other purpose. Temperature readings carried out with thermometers that meet this criterion must be recorded without any correction on the record sheet.

Working thermometers used at 35 °C must be verified by comparison against a reference thermometer; the difference in the readings must be ± 0.2 °C; for the freezing point (0 °C) must be ± 0.0 °C. When there is non-compliance with this criterion, the thermometer must be removed from use. Temperature readings carried out with thermometers that meet this criterion must be recorded in the sheet without any correction on the record sheet.

- Working thermometers used in refrigerators must be verified at 0 °C against a reference thermometer, the difference in the readings must be between ± 0.5 °C. When there is non-compliance with this criterion the thermometer must be removed from use. Temperature readings carried out with thermometers that comply with this specification must be registered without correction of the reading.
- Working thermometers used at 30 °C, must be verified by comparison against a reference thermometer, the difference in the readings shall be ± 0.5 °C. When not meet this criteria the thermometer shall be removed from use. Temperature readings taken with thermometers that meet this criteria must register without making any correction in the record book.
- Other working thermometers shall be checked using the criteria published by CCAYAC. CCAYAC-CR-013.

The standard/reference thermometers must be calibrated annually at the freezing point (0 °C), any change in this will be interpreted as a change of equal magnitude in all the mercury column, therefore the thermometer must be immediately removed from use.

Mercury or non-mercury thermometers (work or reference) used to monitor temperatures in the range of 0 - 45.5 °C must be reviewed and records of the absence of fractionation column must be kept, the thermometers that do not meet the criterion must be immediately removed from use.

3.1.3. OVENS

Hot air ovens must be of sufficient size to avoid internal overload, constructed in such a way that provide an adequate sterilization temperature, equipped with thermometers capable of accurately recording intervals from 160 °C to 180 °C. The use of high temperature recorders is optional but desirable.

QUALITY CONTROL

The performance of the oven must be verified every three months using commercially available strips of biological indicators for dry heat sterilization. **Caution: glass vials must not be used in the ovens**

3.1.4. AUTOCLAVES

The autoclaves must be of sufficient size to avoid an internal overload and to provide a uniform temperature inside the chamber until it reaches the sterilization temperature of 121 °C. (Market-Forge® brand quite meets these requirements). Equipped with working dataloggers verified annually at temperatures of 100 °C and 121 °C that meet the calibration criterion of ± 1 °C (references data loggers must be calibrated each 5 years). The pressure gauges and safety valves must be adjusted and calibrated, connected directly to the steam supply line or to the steam generator. The autoclave must be able to reach the required temperature in less than 30 min.

QUALITY CONTROL

The sterilization cycle must be evaluated with Sterikon plus. .

RECORDS

Records of each sterilization cycle must be kept and shall include: date, time of entry of the material (culture media) to the autoclave, start and end time of the sterilization cycle (121 °C for 15 minutes for culture media), check-out time of the material from the autoclave, total time of exposure to heat (<45 min for media whit carbohydrates), sterilized material and operator of the cycle. Keep records of each run, verification of the sterilization (spores), as well as the maintenance and repairs made to the autoclave.

3.1.5. PH METER AND ELECTRODE

INSTRUMENT

Use electronic pH-meters (potentiometers) with standard accuracy 0.1 pH units to determine the pH of the culture media and reagents. This must be equipped with an automated temperature compensator (ATC) device and a pH electrode with half cells and reference half cells or equivalent combination electrodes free from Ag/AgCl or contains a double junction barrier preventing passage of Ag ions into the medium which may affect the accuracy of the pH reading.

QUALITY CONTROL

Measure the pH only at room temperature (16 °C - 27 °C). The pH meter must be calibrated daily or with each use. A minimum of two standard buffer solutions must be used to calibrate the pH meter. The first must be near the electrode isopotential point (pH 7). The second near the expected sample pH (i. e. : pH 2.0, pH 4.0, or pH10.0) following the user manual.

Standard buffer solutions must be used once and discarded.

The electrode acceptability must be determined daily or with each use by the millivolt (mV) procedure or through determination of the slope. Either that the instrument performs it automatically or is calculated with the readings in millivolts (mV). The slope is a function, reported as percent (%) of the mV measurement divided by its theoretical value. The expected slope must be between 95% - 102 %, in the case of failure to comply with this criterion, the electrode must be replaced by a new one, for which the laboratory will take into account this condition.

MAINTENANCE

Always follow the user manual. In general, the pH electrode must be cleaned periodically using commercially available cleaners for pH electrodes or with NaOH 0.1 N. The pH electrode in use must be kept immersed in a buffer solution at pH 7.0 or preferably in an electrode storage solution according to manufacturer's specifications. The refillable electrodes must be kept properly filled with the appropriate solution according to manufacturer's specifications. Empty and replace filling solutions if there is an occurrence of crystals. The plastic cap of the filling hole of refillable electrodes must be removed for reading the pH. Having done the reading, the cap must be put back to avoid evaporation and accelerated formation of crystals. When non-refillable electrodes are used it must be changed at least every three months, the absents of those represent a critical finding

RECORDS

Records of pH calibrations, calculations of the slopes and the date on which the electrode began operations must be kept. All pH measurements performed with the instrument and maintenance made to the equipment must be recorded. Keep records of all maintenance and repairs performed.

If using pH paper (for the homogenized preparation in the extraction of marine biotoxins), it must have a range of 0 – 6 or equivalent , with a variation of 0.5 pH units.

3.1.6. BALANCES

For microbiology methods and marine biotoxins rapid tests, use balances that provides a sensitivity of at least 0.1 g at weights of use.

For marine biotoxins chromatographic methods use balances with a sensitivity of 0.01g and 1mg when less than 2g are used

As is indicated in CCAYAC –CR-013 and guidelines for laboratory evaluation, balances must be verified each day of use, using at least two weights, close to the weight of use, using NIST Class S or ASTM Class 1 or 2 weights or equivalent.

The following are suggested weights:

- For culture media, 10 g, 50 g or 100 g, if media is weigh on the flask includ 500 g or 1000 g considering the flask weigh .
- For SRT-PSP 100 g y 500 g
- For PP2A and SRT-ASP 5 g and 20 g or 50 g

Balance must be calibrated annually.

INSTRUMENT

Use scan microplates spectrophotometers up to 96 wells or similar, with a sensitivity of ± 0.01 nm at 405 nm, preferably with an integrated incubator calibrated at $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a sensitivity of $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

QA

Use reagent grade water free of impurities; for measuring the background noise at 405 nm and ensure that the equipment is within the operating conditions. In addition, you must calibrate equipment using check plates with absorbance at 405 nm (according to equipment type and manufacturer), maintain records of these services.

MAINTENANCE

In any case always follow the manufacturer's specifications . In general, you shall perform the cleaning of the filters according to the user manual and only with the solutions specified there in; This service must be done by a trained and supervised person must perform the procedures in "check" internal when available on the device.

RECORDS

Qualifications and calibration records must be kept as well as each of the maintenance performed, analytical and final runs, the maximum and minimum temperatures of the incubation chamber while the process (at least 2, at the beginning the process) and a record of the absorbance obtained with the filter used. You shall clearly specify the state of the equipment.

3.1.7. SPECTROPHOTOMETER (READER PLATE)

INSTRUMENT

Use scan microplates spectrophotometers up to 96 wells or similar, with a sensitivity of ± 0.01 nm at 405 nm, preferably with an integrated incubator calibrated at $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and a sensitivity of $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

QA

Use reagent grade water free of impurities; for measuring the background noise at 405 nm and ensure that the equipment is within the operating conditions. In addition, you must calibrate equipment using check plates with absorbance at 405 nm (according to equipment type and manufacturer), maintain records of these services.

MAINTENANCE

In any case always follow the manufacturer's specifications . In general, you should perform the cleaning of the filters according to the user manual and only with the solutions specified there in; This service must be done by a trained and supervised person must perform the procedures in "check" internal when available on the device.

RECORDS

Qualifications and calibration records must be kept as well as each of the maintenance performed, analytical and final runs, the maximum and minimum temperatures of the incubation chamber while the process (at least 2, at the beginning the process) and a record of the absorbance obtained with the filter used. You should clearly specify the state of the equipment.

3.1.8. PIPETTES

The pipettes may be of clean borosilicate glass or plastic, sterile disposable or reusable must be operated using bulbs or pro-pipettes. The material must not be toxic, as established in the test method and must not have any damage. The size must be suitable to accommodate the required volume quickly and accurately with unbroken tips and are appropriately graduated. Pipettes with broken tips or nozzles must be discarded. The pipettes must be graded and marked clearly. Do not use pipettes greater than 10% of the volume to be transferred. Do not use pipettes greater than 10 mL to transfer 1 mL. Do not use pipettes greater than 1 mL to transfer volume of 0.1 mL.

The volumetric material must be verified annually or according to their use and variation, must not be greater than the tolerance allowed for the classification of the material.

Disposable pipettes must be used only once and be discarded. For microbiological analysis, use only bacteriological pipettes. Classic transfer pipettes must be purchased with the following specifications from APHA:

Tolerance and Precision:

Capacity (mL)	Graduated in (mL):	Tolerance (mL)	Precision* (mL)
1.0	0.10	± 0.01	± 0.01
5.0	0.10	± 0.02	± 0.02
10.0	0.10	± 0.03	± 0.03

*All the transfer pipettes must comply with this precision at 20 °C. Volumes must be transferred in 2 to 4 seconds.

1. **Pipettors:** stainless steel or preferably aluminum. Avoid using copper pipettors. Sulfite pulp paper Kraft resistant to carbonization can be used.
2. **Pro-pipettes:** several pro-pipettes, fillers, pumps or dispensers are available in order to avoid contamination and the risk for mouth pipetting, which is prohibited.

TOLERANCE VALUES FOR PIPETTES

Use only Class A pipettes with the tolerances specified in the test methods. The precision is critical for the chemical determinations.

Considering that the tolerances are certified by the manufacturers or suppliers is not necessary to verify again the volume of the pipettes, unless there is suspicion of a problem.

VERIFICATION

Verification of pipettes must be performed according to the criteria published by CCAYAC.

TRANSFER PIPETTES (TD)

These pipettes are designed to discharge the precise amount, when the tip of the pipette is supported on the walls of the receiving container until the draining stops. Certain classes of serological pipettes are calibrated to discharge the indicated volume with a small amount of liquid remaining in the tip when discharge has finished. These pipettes can be marked with a wide opaque ring, two narrow opaque rings or two printed rings near the nozzle.

PIPETTES TO CONTAIN (TC)

This type of pipettes is calibrated to contain the specified amount. They must be completely empty to ensure the discharge of the specified volume. These pipettes are used in many operations where it is necessary to ensure the precision at the dilutions, which is achieved by rinsing the pipette after the initial discharge with solution of dilutions.

If sterile disposable pipettes are used, sterility must be verified for each manufacturing batch, randomly selecting a representative number of pipettes. If reusable pipettes are used, these must demonstrate its sterility, per batch of sterilization.

3.1.9. MECHANICAL OR ELECTRONIC MICROPIPETTES

There are numerous varieties of micropipettes that can be used in the analysis. These can be mechanical or electronic. While these instruments can be purchased from fixed or variable volume, it is preferable to use micropipettes calibrated at fixed volumes. There are sterile disposable tips which can be adapted for microbiological analysis. Discharge volumes must be verified before using any micropipette. If it is not marked with the serial number, it must be permanently marked with a unique identifying code.

QUALITY CONTROL

When the precision cannot be determined by measuring the volume discharged with a graduated test tube class A (in the common case of pipettes for volumes ≤ 1.0 mL) the following procedure must be used to determine the precision by gravimetry. This procedure is recommended for all micropipettes that distribute volumes ≤ 1.0 ml.

VERIFICATION OF MICROPIPETTES

This activity is used to verify gravimetrically the volume discharged by the micropipettes. Both the equipment and the water for the test must be placed in an environment between 19 °C to 24 °C for at least two hours before the test. CCAYAC criteria's of verification shall be applied.

Before each use, operate the micropipette repeatedly to allow the distribution of the lubricant and to ensure smooth operation. Micropipettes shall be sent to a qualified technician, if verification failures or any repairs.

Must maintain records of each calibration, verification, maintenance and / or repair is made to the micropipette.

3.1.10. WATER BATHS

Water baths must have a distribution study, demonstrating a homogeneous temperature distribution in the range indicated in the method or by the manufacturer, whichever is lower

The water bath for fecal coliform must maintain a temperature of $44.5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ under all loading conditions, . The water bath must have a cover to prevent evaporation and heat loss it must have recirculation of water to ensure a uniform temperature at any point. The thermometers used in the water bath may be the ASTM-64C or ASTM-S64C. Only racks made of stainless steel, latex, plastic, vinyl or other corrosion-proof material can be put inside.

The water bath for determination of phosphatase PP2A, must maintain a temperature at $76 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The water bath shall have a cover that prevents evaporation and heat loss. Furthermore, for verification of the bath temperature, use a thermometer $0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ to $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ with $1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ divisions.

CAUTIONS

Ensure that the water level is always above the level of the culture medium. Ensure that the water in the bath is kept clean.

RECORDS

Keep records of temperature and any repair or maintenance performed to the water bath.

3.2. MATERIALS

3.2.1. UTENSILS FOR PREPARATION OF CULTURE MEDIA

Utensils, containers and sample containers must be clean borosilicate glass, stainless steel or other non-corroding materials i.e. plastic with rubber stoppers, caps or screw caps with nontoxic liners. The graduations are indelibly marked on dilution bottles and tubes or an acceptable alternative method is used to ensure appropriate volumes. The culture tubes are of a suitable size to accommodate the volume for nutritive ingredients and samples.

The reusable material must be free of scratches, breakage, bubbles or other defects and capable of being properly washed and sterilized.

3.2.2. DURHAM TUBES

They must always be new, never reused.

3.2.3. PIPETTE CANISTERS

The canisters used must be in aluminum or stainless steel; cylindrical or rectangular, with a length of 40 cm and a diameter of 5 cm to 7.5 cm. They can be replaced by paper wrapper free of toxic substances or such that it adheres to the pipette. Avoid the use pipette containers made of copper or copper alloys.

3.2.4. BOTTLE FOR DILUTION OR TUBES

Dilution bottles and tubes are made of glass, preferably borosilicate, glass-stoppered, rubber, screw cap or cap of stainless steel that does not generate toxic or bacteriostatic compounds throughout of sterilization. Do not use cotton plugs. Graduation of dilution bottles or tubes must be indelible.

3.2.5. FERMENTATION TUBES

Use fermentation tubes of borosilicate with screw cap or stainless steel cap, of sufficient size to contain the required volume of culture media and sample. The caps must not release volatile, toxic or bacteriostatic products during sterilization. Do not use cotton plugs.

3.2.6. SAMPLING CONTAINERS

To collect samples the use of bottles of inert hard plastic that are able to withstand sterilization is recommended, they must have adequate capacity as for that the total sample volume (> 110ml) occupies no more than three quarters of the container, it must allow sufficient space of approximately 2.5 cm to facilitate an adequate homogenization of the sample in the laboratory. All bottles must be sterilized and each batch must have a sterility test. When the bottles are deformed after sterilization they must be rejected and make a complaint to the manufacturer.

Samples must be handled properly in order to avoid cross -contamination until the analysis is completed. Plastic bottles resistant to autoclave sterilization at 121 ° C for 15 minutes (such as high resistance Nalgene), non-deformable and not producing toxic or bacteriostatic substances can be used. The caps can be threaded with gaskets that do not produce toxic or bacteriostatic substances during the sterilization. Cover the bottles with aluminum foil or other waterproof material up to the neck before sterilization.

3.3. WASHING AND STERILIZATION

3.3.1. WASHING

To clean all laboratory glassware/labware, use an alkaline detergent i.e. extran alkaline, a succession of at least (4) fresh water rinses plus a final rinse of distilled/deionized water is used to thoroughly rinse off all the detergent. . The laboratories can standardize other washing procedures, proving to be effective in washing and removal detergent.

When washing machines are used, they shall follow manufacturer procedures and the verification of results protocols.

The rinsing effectiveness must be verified daily taking several dry pieces from each load . and test for residual detergent (acid or alkali) with an aqueous 0.04 % bromothymol blue ; pH between 6 - 7 pH (ideal) and for adding water to the material, this must be free of foam after shaking it vigorously. Keep records.

3.3.2. STERILIZATION

The glass sample container must be sterilized for not less than 60 minutes at 170 °C. Reusable pipets (in canisters) must be sterilized at 170 °C for not less than 2 hours. Other conditions must be validated. Keep records.

All plastic material (sample containers) suitable for sterilization must be autoclaved for 15 minutes at 121 °C. .

Spore strips must be used to evaluate the effectiveness of the each sterilization process in the hot-air oven and Sterikon plus must be used for the autoclave process.

Sterility controls of the material must be performed for each sterilization cycle and each batch of sterile material

3.4. WATER

The reagent water system must provide distilled or dionized water with > 0.5 megohms-cm resistance (2 megohms-cm in-line) or less than 2.0 μ Siemens/cm conductivity at 25 °C. Keep records. Reagent water must contains < 100 cfu/mL as determined monthly using the heterotrophic plate count method. Microbiology control should be done montly and shall be < 100 UFC/mL, records shall be keep. Chlorine must be determined monthly and must be lest than or equal to 0.1 mg/L (0.1 ppm). the use of water jugs of distilled or deionized water is not recommended.

For the preparation of culture media is not necessary to carry out the determination of heavy metals, however it is necessary for the preparation of reagents required for the determination of biotoxins. The water must be free of traces of dissolved metals: < 0.05 mg/L of Cd, Pb, Cr, Cu, Ni, and Zn or a content of total metals less than 0.1 ppm (mg/L) annually. .

MAINTENANCE

Water systems must be cleaned and/or cartridges must be changed at the intervals according to manufacturer's instructions or in accordance with the quality controls. When results where out of specification corrective actions shall be implemented.

RECORDS

Keep records of water quality control results and all the maintenance activities carried out to the water system.

3.5. CULTURE MEDIA

3.5.1. PREPARATION OF CULTURE MEDIA

The formula of the culture media and reagents is described in each methods of analysis.

Dehydrated culture media must be used, unless otherwise indicated.

When using dehydrated culture media must be prepared and sterilized according to manufacturer's instructions, its quality control must be performed by each batch of dehydrated culture media.

The QC of culture media prepared from the individual components, must be performed per batch of prepared culture media.

3.5.2. STORAGE OF CULTURE MEDIA

Dehydrated media and media components must be properly stored in a cool, clean and dry place. Dehydrated media must be labelled with the date of receipt and open.

The manufacturer must indicate the expiration date, Keep records of quantity, appearance, lot number and expiration date. Discard culture media that are caked or expired media or media components . Do not use reagents or solutions without label, altered or expired. .

All culture media prepared in the laboratory must be identified with the media name, lot and preparation or expiration date. .

The Lauryl Tryptose Sulphate Broth or Lactose Broth shall be stored at room temperature for no more than 7 days, protected from light. All tubes must be inspected before use and those with the presence of bubbles must be discarded before its use.

3.5.3. ADJUSTING PH

An increase in the concentration of hydrogen ions (decrease of pH) during the sterilization may vary slightly depending on the autoclave that is used, and the initial reaction will require an adjustment to obtain the correct final reaction. Declines in the pH readings must be between 0.1 to 0.2; occasionally they may be greater than 0.4 pH units. When in the media there is a presence of phosphate buffer salts, it is expected that these changes of pH to be insignificant; therefore, the pH of these broths must not be adjusted. The verification of the pH must be performed only at the end of the sterilization process; this must comply with the pH ranges of the dehydrated media recommended by the manufacturer, any changes in the pH value may be associated to the quality of the water used, or defects in the preparation.

3.5.4. STERILIZATION

In general culture media must be sterilized at 121 °C \pm 2 °C for 15min or according the manufacturer's instructions. When the pressure reaches zero, the media must be removed from the autoclave to avoid any alteration. To allow a uniform heating and a rapid cooling, the plugs shall be slightly loose and in small quantities.

Culture media commercially purchased, are prepared and sterilized according to the manufacturer's instructions.

Total time of exposure of sugar broths to autoclave temperatures must not exceed 45 minutes, Keep records.

3.6. QUALITY CONTROL OF CULTURE MEDIA AND OF THE METHOD OF ANALYSIS FOR FECAL COLIFORMS

3.6.1. MATERIALS

- Culture of *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*. in nutrient agar (as standard count agar, STA)
- Tubes with Lauryl tryptose (LST), Lactose (LB) or EC broth.
- Inoculating loops.

3.6.2. PROCEDURE FOR THE POSITIVE CONTROL (*ESCHERICHIA COLI*)

Inoculate a tube of Lauryl tryptose broth with *Escherichia coli* in agar slants. Incubate the tube to $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 24 hours. Take a inoculating loop of $1\text{ }\mu\text{L}$ and insert it into the suspension. Inoculate 100mL of dilutions with $1\text{ }\mu\text{l}$ of the suspension. This is equivalent to dilute the suspension approximately between 9 and 12×10^3 cells/mL. Mark the bottle of dilution and leave it at room temperature. Keep for 7 days.

When a positive control is needed, shake the bottle and introduce a disposable inoculating loop of $1\text{ }\mu\text{L}$ into the bottle of dilutions and inoculate the tube. The inoculation loop must have from 9 to 12 cells of *Escherichia coli*. Incubate the tube along with the samples analyzed.

3.6.3. PROCEDURE FOR THE NEGATIVE CONTROL (*ENTEROBACTER AEROGENES*)

Use a sterile loop or needle of inoculation and inoculate the tube with the broth directly from the culture in slant agar of the negative control. For the negative control, it is not important to use a minimum number of viable cells.

4. COLLECTION, TRANSPORTATION AND RECEPTION OF SEAWATER AND SHELLFISH SAMPLES FROM CLASSIFIED GROWING AREAS FOR LABORATORY ANALYSIS.

All samples must be taken in compliance with a sampling program. The Laboratory which will carry out the analysis, the Commission of Sanitary Enforcement (COS) and CCAYAC, must be aware of the sampling program.

The samples must be properly identified (labeled) with the following data

- Name of the product
- Name of the inspector
- Growing area
- Date and time of sampling or collection

4.1. SAMPLE TAKING AND TRANSPORT

4.1.1. SEAWATER

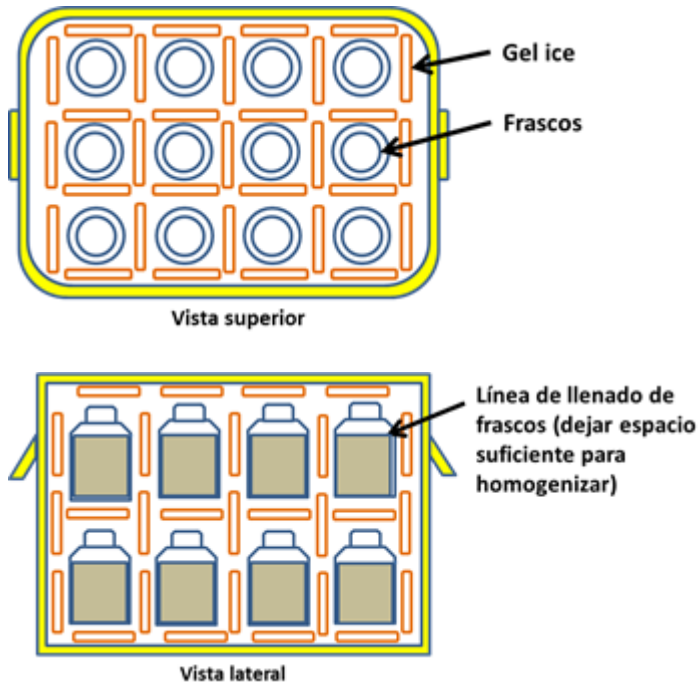
The sample containers must be clean, sterile, watertight and properly labeled. A description of suitable bottles and its preparation is described in section 3.2.6 of this document. The bottles must be protected from contamination during and after sample collection.

Surface samples can be collected without the assistance of any specific device. The container must be kept closed until the moment of the sample collection. During the sampling, avoid cross contamination of the lid and the mouth of the bottle. . When taking the sample hold the container near its base and immerse it upside down. Turn the bottle slightly to bring the mouth upward during filling, bring the bottle horizontally forward in the opposite direction of the hand to prevent contamination. To facilitate homogenization in the lab, fill the bottles up to $\frac{3}{4}$ th of the total volume. The sample size in each spot is 110mL.

At the beginning of the sampling, a control sample must be taken and labeled appropriately.

Temperature must be taken in each sampling spot and recorded in the field spreadsheet.

Samples must be transported in closed containers (such as coolers) containing gel-ice. Regular ice must never be used. The arrangement of samples and the gel-ice must ensure that all samples are surrounded by the gel-ice (alternatively electric coolers can be used) to ensure that samples are transported in an environment of 8 °C. Once the containers have been closed, they must not be opened until its reception in the Laboratory. There is no need of changing the gel-ice; the amount must be sufficient, to ensure that the samples will arrive at a temperature below that of which they were collected. Achieve the example:



Bacteriological analysis must be carried out as soon as possible after sample is taken; preferably within the first hour following the collection. Samples must be transported in a cooler with gel-ice until its analysis. The samples must not be analyzed if they have been stored for more than 30 h. In this regard, each Laboratory is responsible for the establishment of a maximum time for sample reception, considering their operating conditions, but this shall be less than 26h, unless it is justified for specific areas. The maximum time of receipt of samples, must be established in the sop for samples reception.

4.1.2. SHELLFISH FOR BIOTOXINS

The samples must be chosen from the shellfish species which are more prone to reveal an early presence of toxins and that are suitable to show the highest concentration levels of them (sentinel species). Alternatively, other species may be used as indicators of marine biotoxins, in such cases and when there is a positive result by screening methods, a precautionary closure of the area for all species of shellfish will be established. If the positive result of the screening method is confirmed by the reference method and it exceeds the regulatory limits, then the area will also be precautionary closed. For the area to be reopened, all the species must be analyzed using the reference method and demonstrate that they are free of marine biotoxin or that marine biotoxin levels are below regulatory limits. In order for the reopening to occur any other applicable guidelines must also be observed.

Samples must be transported in a closed container (such as coolers) containing gel-ice, regular ice must never be used. Once the containers are closed they must remain so until its reception in the laboratory. There is no

need of changing the gel-ice after each sampling receiving, the amount must be sufficient, to ensure that the samples will arrive at a temperature below that of which they were collected.

The time from sampling to the analysis shall not be greater than 24 h. Table 1 describes sample amounts depending on the species of shellfish, for each type of marine biotoxin. Those amounts can be different than specified base on the product, is necessary to guaranty 150 to 250g of tissue, when all determinations where done, the highest number of shells may be 60 and the 30 shells the lowest.

Table 1. Requirements for the analysis of Shellfish samples.

Species	Requirement	DSP			ASP	PSP	NSP
		MBA	HPLC-MM	PP2A			
All species, except <i>Panopea spp.</i>	Part of the organism	Whole Body					
	Number of pieces per determination ³	12-30					
<i>Panopea spp.</i> ¹	Part of the Organism	Visceral mass ²			Visceral mass	Visceral mass	Whole Body
	Number of pieces per determination	3			3	3	3

1. According to what was indicated by FDA for exports to the United States, regarding the control of areas listed for export to the US. For national surveillance and export to China the whole body must be analyzed.

2. -The visceral mass or visceropallium, is the soft-metabolic non-muscular region of the shellfish. Contains the body organs.

3. -. When using the whole body, you shall consider the productivity of the shellfish.

4.2. TRANSPORTATION OF SAMPLES

4.2.1. SENDING SAMPLES TO CCAYAC

Before sending samples is necessary to notify to CCAYAC, the sending number by text message in the chat of "contingencia PMSMB" and as soon as possible emailing to:

- caguzman@cofepris.gob.mx
- srodriguez@cofepris.gob.mx
- cgalvez@cofepris.gob.mx
- mcastilloc@cofepris.gob.mx
- irguzman@cofepris.gob.mx
- pmsmb.ccayac@gmail.com

4.2.1.1. SENDING SAMPLES BY COURIER SERVICE:

- All samples must be sent in the name of: Ismael Escamilla, Alejandro Huerta, Sergio Rodriguez, Gilberto Marquez Cruz, Marco Antonio Ramírez Reséndiz
- Attach the official letter of request.
- The delivery of samples from 8:00 to 17:00 h from Monday to Thursday must be guaranteed.
- Any changes can be made if notified in advance (24 h).

4.2.1.2. SENDING-RECEIVING SAMPLES TO BE COLLECTED AT THE AIRPORT:

It shall be considered that the samples will be picked up at the following times.

- 7 hrs
- 11 hrs
- 15 hrs

All samples must be sent in the name of: Ismael Escamilla, Alejandro Huerta, Sergio Rodriguez, Gilberto Marquez Cruz, Marco Antonio Ramírez Reséndiz.

Attach the official letter of request.

Any changes can be made if notified in advance (24 h)

The analysis shall be performed immediately after the reception of the sample.

The results must be notified within the first 12h after the reception of the sample in the case of fast track methods for bio toxins; within the first 24h for conventional methods for bio toxins and within 76h for the microbiological analysis of sea water.

4.2.2. SENDING SAMPLES IN LESP

The shipment of samples must be agreed upon the user and the laboratory. Samples can be received in the laboratory provided it is ensured the delivery within working hours of the Laboratory preferably from Monday to Wednesday. Any changes can be made if notified in advance. (24h). The analysis of marine biotoxins must be carried out immediately after the reception of the samples. The results must be notified officially within the first 12h after sample reception.

Notification of reports of results must be sent to the state regulatory area, the COS and CCAYAC.

In justified cases e.g. when the sample is received after the reception hours, results may be reported until the 9 h of the next day.

In case of a positive result, it must be notified immediately (by the head of the area) via e-mail to and “chat de contingencias”:

- State regulatory authority
- COS

CCAYAC sample reception

All samples must be taken in accordance with a sampling program and the following stakeholders must be aware of it:

- The test laboratory
- COS
- CCAYAC

The samples must be properly labeled with the following data:

- Name of the product
- Name of the person who takes the sample
- Growing area and sampling spot
- Date and time of sampling or collection

The samples must be accompanied by:

- The official letter of analysis request, where the sampling area is identified, the purpose of sampling (national surveillance, export), the type of samples (shellfish, sea water) and other relevant data for sending the results.
- Field Sheet describes the relevant data such as: temperature of sampling, sample type, growing area, requested analysis, date and hour of the monitoring and name of the inspector. The record of the dates must be done considering the following format DD/MMM/YY.

The samples must be received in Styrofoam or plastic coolers, accompanied by refrigerant, the temperature of reception must be less than the temperature at the moment of sampling.

The time from sampling to the analysis shall not be greater than 24 h.

At the time of sending the sample, the remitter must notify CCAYAC the tracking number immediately by text message to the chat of “MSSP Contingency” and as soon as possible via e-mail to the following addresses:

- caguzman@cofepris.gob.mx
- srodriguez@cofepris.gob.mx
- cgalvez@cofepris.gob.mx
- mcastilloc@cofepris.gob.mx
- irguzman@cofepris.gob.mx

- pmsmb.ccayac@gmail.com

4.2.3. SENDING EXTRACT OR SAMPLES TO CCAYAC FOR CONFIRMATION

The approved laboratories for the analysis of marine biotoxins by screening methods must notify the sample sendings to the CCAYAC

According to the biotoxin's contingency plan when there is a positive result, the following information shall be report:

- Kind of marine biotoxin.
- Harvest area.
- Sending number
- The laboratory must notified When the extraction were done in a different amount than indicated in the method.

That notification shall be done immediately using the next vias:

1. Contigency chat
2. Emailing to:
 - a. caguzman@cofepris.gob.mx
 - b. srodriguez@cofepris.gob.mx
 - c. cgalvez@cofepris.gob.mx
 - d. mcastilloc@cofepris.gob.mx
 - e. irguzman@cofepris.gob.mx
 - f. pmsmb.ccayac@gmail.com
 - g. controlanalitico@cofepris.gob.mx
 - h. psuarez@cofepris.gob.mx
 - i. garroyo@cofepris.gob.mx
 - j. lisanchez@cofepris.gob.mx
 - k. ampichardo@cofepris.gob.mx
 - l. mstone@cofepris.gob.mx
 - m. mcastilloc@cofepris.gob.mx

Extracts and samples must be correctly identify with the next information:

- Name of product.
- Name of people take the sample.
- Growing area.
- Date and time of sampling

Samples must be received in coolers, accompanied by refrigerants (gel ice). The time elapsed from its reception in CCAYAC to the issuance of the report of results, must be less than 24h.

4.3. SAMPLES RECEPTION CRITERIA.

Samples shall be recited according to the monitoring plan

Extracts and samples must be correctly identify with the next information:

- Name of product.
- Name of people take the sample.
- Growing area.
- Date and time of sampling

Samples shall be have the next.

- Official request for analysis, specifying the growing area, kind of sampling, kind of sample, and the information for sending results.
- Field sheet, where relevant information is specified as: sampling temperature, kind of sample, growing area, analysis request, date and time of sampling, name of the sampler.

4.3.1. RECEPTION OF SEAWATER SAMPLES

The sample containers must be made of hard plastic resistant to sterilization by autoclave, with a sufficient volume to contain at least 110ml of seawater sample in the $\frac{3}{4}$ th of the bottle and provide a suitable space (2.5 cm) to allow the homogenization of the sample in the laboratory. The containers must be clean, sterile, airtight, and properly labeled or identified individually; it shall be verified that the data of the sample containers match with those stated in the request of analysis and the field sheet (harvest area, sampling station, time, date and place of collection, collector's name, and sample code).

Samples must be accompanied by a blank, which must be taken at the beginning of sampling in the first sampling station; the field sheet must record the sampling and the sea water temperature at the time of collection. In the laboratory, the temperature of the blank at the time of reception must be recorded and verify that it is below the temperature at the time of collection. If this is not the case this is a reason of rejection.

Laboratories must measure and record the temperature of the blank at the moment of reception, and verify that is lowest than the temperature in the moment of sampling. Also shall be ensuring that all samples were collected and carried in the same conditions. If any of the above were complying, samples shall be rejected.

After monitoring, samples must be transported in a cooler, using gel-ice, until its analysis, never use ice. These samples shall be delivered as soon as possible to the laboratory; avoiding delays, as well as transferring the sample to new containers or changing the refrigerants or any other activity that delay the delivery or modify the initial conditions of monitoring. For specific areas a exceptional maximum time for reaction, may de established but always shall be lest than 26h.

Laboratories must have records of rejections, and analysis of rejection causes shall be done, and corrective actions shall be implemented.

4.3.2. RECEPTION OF SHELLFISH

4.3.2.1. SHELLFISH STOCK (SHELLFISH IN THE SHELL)

Samples of shellfish shall be collected in clean containers. The container shall be waterproof, and shall be durable enough to withstand the cutting action of shellfish and abrasion during transportation. Waterproof paper bags, paraffined cardboard cups or plastic bags are suitable types of containers. .

The number of pieces must be indicated taking into account the species concerned (table 2), in general, a minimum of 12 shellfish shall be taken in order to obtain a representative sample and to allow for the selection of sound animals suitable for shucking. With most species, allowing for the necessary culls, approximately 200 g of shell liquor and meats will be obtained.

Because of their larger size, 10 to 12 of certain species, such as the *Pacific oyster*, *Crassostrea gigas*, the surf clam, *Macra solidissima*, and certain larger sizes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, may produce more than 200 g of shell liquor and meats. It is desirable to use at least 12 animals for sample.

On the other hand, 10 or 12 of certain other species, such as the Olympia oyster, *Ostrea lurida* and small sizes of the Pacific little neck clams, *Protothaca staminea* and *Tapes japonica*, may produce much less than 100 g of shell liquor and meats, as many as 20 to 30 of these species would be required to produce an adequate volume for proper blending.

The samples of shellfish must maintain the valves closed, the container must be labelled with the collector's name, type of shellfish, the source or harvest area, sampling station, time, date and place (if applicable) of collection.

Immediately after collection, shellfish samples are placed in dry storage (ice chest or equivalent) which is maintained between 0 and 10 °C with ice or cold packs for transport to the laboratory. Once received, the samples are placed under refrigeration unless processed immediately. This point is a critical. .

The analysis of the samples shall be initiated as soon as possible after collection. Due to the need of taking sanitary actions, the samples must be analyzed within the first 24 h after collection, after this time the shellfish are not tested. This is a critical point.

4.3.2.2. SHUCKED SHELLFISH

A sterile wide mouth container of sufficient capacity with watertight closure is an acceptable container for samples of shucked shellfish taken in shucking houses, repacking establishments or bulk shipments in the market. The shellfish may be transferred to the sample jar with sterile forceps or spoon. Samples of the final product of shucking houses or re-packing establishments may be taken in the final packing cans or containers.

. The comments pertaining to species of various sizes in the section on shell stock applies to shucked shellfish Consumer-size packages are acceptable for examination, provided that they contain an adequate number of animals.

Samples of shucked shellfish shall be refrigerated immediately after collection by packing in crushed ice and they shall be so kept until examined.

4.3.2.3. FROZEN SHUCKED SHELLFISH

If the package contains an adequate number of animals (10 to 12), one or two packages may be taken as a sample. Samples from large blocks may be taken by coring with suitable instrument or by quartering, using sterile technic. Cores or quartered samples shall be transferred to sterile wide mouth jars for transportation to the laboratory. shall

It is desirable to keep samples of frozen shucked shellfish, in the frozen state at temperatures close to those at which the commercial stock was maintained. When this is not possible, samples of frozen shucked shellfish shall be packed in crushed ice and kept so until examined. shall

5. ANALYSIS OF SHELLFISH AND SEAWATER

5.1. PREPARATION OF THE SHELLFISH FOR ANALYSIS

5.1.1. SHUCKING PROCESS

Before starting the process of removing the content from the shell, the hands of the examiner must be thoroughly scrubbed with soap and water, rinse with a solution of alcohol at 70 %.

5.1.2. CLEANING THE SHELLS

Scrape off all growth, loose material from the shell and scrub the shell stock with a sterile stiff brush running water of drinking water quality, paying particular attention to the crevices at the junctions of the shells. Place the cleaned shell stock in clean containers or on clean towels and allow draining in the air.

5.1.3. REMOVAL OF SHELL CONTENTS

Before starting the removal of shell contents, the hands of the examiner must be thoroughly scrubbed with soap and water and rinse with 70 % alcohol.

Open the shellfish as directed below, collecting the appropriate quantities of shell liquor and meats in a sterile blender or other suitable sterile container. A representative sample of at least 12 shellfish must be used for the analysis. At least 200 grams of shellfish or a quantity of meat sufficient to cover the blender blades must be used for the analysis.

Sterile phosphate buffered dilution water must be used as the sample dilution and it's blended at high speed for 60 to 120 seconds until homogenous.

5.1.3.1. OYSTER

Hold the oyster in the hands or on a fresh clean paper towel on the bench with the deep-end part of the shell on the bottom. Using a sterile oyster knife, insert the point between the shells on the ventral side (at the right when the hinge is pointed away from the examiner), about $\frac{1}{4}$ the distance from the hinge to the bill. Entry may also be made at the bill after making a small opening with a sterile instrument similar to bone-cutting forceps.

Cut the abductor muscle from the upper flat shell and pry the shell wide to drain the shell liquor into a sterile tared beaker, wide mouth jar, or blender jar. The upper shell may then be pried loose at the hinge, discarded and the meats transferred to the beaker or jar after severing the muscle attachment to the lower shell.

5.1.3.2. HARD CLAMS

Entry in to the hard clam, *Mercenaria mercenaria* or the Pacific little neck clam, is best done with a sterile, thin-bladed knife similar to a paring knife. . To open the clam, hold it in the hand, place the edge of the knife at the junction of the bills, and force it between the shells with a squeezing motion. . An alternative method is to nibble a small hole in the bill with sterile bone cutting, and with the knife sever the 2 abductor muscles.

Drain the shell liquor into the sample container. Cut the abductor muscle from the shells and transfer the the body of the animal to the sample container.

5.1.3.3. OTHER CLAMS

The soft clam, *Mya arenaria*, the Pacific butter clam, , *Saxidomus giganteus*, the surf clam, *Macra solidissima* and similar species, may be shucked with a sterile paring knife, entering at the siphon end and cutting the abductor muscles first from the top valve and then from the bottom valve.

5.1.3.4. MUSSELS

Mussels, *Volsella* and *Mytilus* species, may be entered at the byssal opening . The byssal threads shall be removed during the cleansing of the shell. The knife can be introduced and the shells moved aside with a twisting motion, allowing the draining of the liquor from the shell. Cut all the parts which are attached to the shell.

5.1.3.5. SHUCKED SHELLFISH

Transfer a suitable quantity from a sample jar to a sterile blender jar or other container, using a sterile spoon.

5.1.4. DILUTION AND GRINDING FOR MICROBIOLOGICAL TEST

Grind for 60 to 120 sec in a laboratory blender operating approximately at 14000rpm. The optimum grinding time between this limits will vary with make of machine, condition of machine, species of shellfish, and probably the physical state of the meats. In general, a grinding time of 60 to 90 sec will be found to be optimum for all species. Excessive grinding in smaller containers shall be avoided to prevent overheating.

5.2. DILUTION AND GRINDING FOR BIOTOXINS.

5.2.1. PREPARATION OF SAMPLE

Clams, oysters and mussels: Thoroughly clean outside of shellfish with fresh water. Open by cutting adductor muscles. Rinse inside with fresh water to remove sand or other foreign material. Remove meat from shell by separating adductor muscles and tissue connecting at hinge. Do not use heat or anesthetics before opening shell, and do not cut or damage body of mollusk at this stage. Collect ca. 100 – 150 g of meats in a glazed dish. As soon as possible, transfer meats to a No. 10 sieve without layering, and let drain for 5 min. Pick out pieces of shell, and discard drainings. Grind in a blender until homogeneous.

Scallops: Separate edible portion (adductor muscle) and apply test to this portion alone. Drain and grind as mentioned before.

Canned shellfish: Place entire contents of can (meat and liquid) in blender, and blend until homogeneous. For large cans, drain meta in large Büchner or sieve and collect all liquid. Determine weight of meat and volume of liquid. Recombine portion of each in proportionate quantities. Blend recombined portions in blender until homogeneous.

5.3. METHODS OF ANALYSIS

Table 2 relates the listing of screening methods and conventional methods that are applicable in support of the MSSP and the NSSP.

Whenever a positive result is obtained by a screening test or the result exceeds the level of acceptance, it must be confirmed by a reference method therefore the laboratory must send the extract and the grinding of the molluscs to CCAYAC, for confirmation of the result.

5.3.1. **TABLE 2.** LIST OF ANALYTICAL METHODS OF THE MSSP, THE NSSP AND RECOGNIZED LABORATORIES

Substance	Type of product recommended	MSSP Method	MSSP/NSSP Method	Level of acceptance	MSSP Laboratories	MSSP/NSSP Laboratories
Paralytic Shellfish Poisoning Toxin (PSP)	Mussel	Screening method: SRT-PSP** CCAYAC-M-322 Scotia Rapid Tests for PSP		Negative	LESP Baja California LESP Baja California Sur ANDA LESP Sonora LESP Sinaloa LESP Nayarit LESP Veracruz LESP Tamaulipas	LESP Baja California LESP Baja California Sur LESP Sonora
		Reference Method: Mexican Official Standard NOM-242-SSA1-2009, Products and services. Fishery products fresh, chilled, frozen and processed. Sanitary Specifications and test methods. B. 3. BIOASSAY FOR PARALYSING TOXIN IN SHELLFISH	Reference Method: Mouse Bioassay (MBA) CCAYAC-M-005⁴ Recommended procedures for examination of seawater and shellfish	800µg/kg o 80 µg/100g	CCAYAC	CCAYAC LESP Baja California**

⁴ Verification of the conversion factor should be done periodically as follows: if the shellfish are analyzed less than once a week, FC is determined each day the test is performed. If the tests are carried out for several days a week, check only once a week. Only for laboratories that have historically demonstrated a statistical consistency, CCAYAC could approve a reduction in the may reduce the frequency of verification.

Substance	Type of product recommended	MSSP Method	MSSP/NSSP Method	Level of acceptance	MSSP Laboratories	MSSP/NSSP Laboratories
Amnesic Shellfish Poisoning Toxin (ASP)	Oyster, Mussel, Clam	Screening method: SRT-ASP CCAYAC-M-324 Scotia Rapid Tests for ASP1		Negative	LESP Baja California LESP Baja California Sur ANDA LESP Sonora LESP Sinaloa LESP Nayarit LESP Tabasco LESP Veracruz LESP Tamaulipas	LESP Baja California LESP Baja California Sur LESP Sonora
		Reference Method: Mexican Official Standard NOM-242-SSA1-2009, Products and services. Fishery products fresh, chilled, frozen and processed. Sanitary Specifications and test methods. B. 4. DETERMINATION OF DOMOIC ACID BY LIQUID CHROMATOGRAPHIC (HPLC)	Reference Method: HPLC/UV CCAYAC-M-001 Modified Method: John Wekell, Michael Quilliam, y James Hungerford, Domoic Acid in Unsalted Fresh or Frozen Shellfish Methanol-Water Extraction LC Method. Evaluation of FDA Officer Chandler, Linda A en mayo 2005 May 2015	20mg/Kg	CCAYAC	CCAYAC
Diarrheic Shellfish Poisoning Toxin (DSP)	Oyster, Mussel, Clam	Screening method: PP2A Phosphatase* CCAYAC-M-323 Abraxis PP2A		< 160 meqOA/kg	LESP Baja California LESP Baja California Sur LESP Sinaloa LESP Sonora LESP Veracruz LESP Nayarit LESP Tamaulipas	LESP Baja California LESP Baja California Sur LESP Sonora

Substance	Type of product recommended	MSSP Method	MSSP/NSSP Method	Level of acceptance	MSSP Laboratories	MSSP/NSSP Laboratories
		<p>Método de Referencia: HPLC- MM CCAYAC-M-334 UE Harmonized backup Method: Bioassay MBA* CCAYAC-M-212 Harmonized EU</p>			CCAYAC	CCAYAC
Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)	Oyster, Mussel, Clam	<p>Reference Method: CCAYAC-M-301/1 Recommended Procedures for the Examination of sea water and Shellfish. 4ta. Ed. 1970. Part. V Bioassay for Shellfish Toxins. APAHA.</p>	Does not apply	20 UR /100 g	CCAYAC	Does not apply

** in implementation

5.3.2. MICROBIOLOGICAL TESTS IN SEA WATER

Analysis of sea water	MSSP Method	MSSP/NSSP Method	MSSP Laboratories	MSSP/NSSP Laboratories
Fecal Coliforms	Mexican Official Standard NOM-242-SSA1-2009, Products and services. Fishery products fresh, chilled, frozen and processed. Sanitary Specifications and test methods. B. 17. Estimation of microbial density by the technique of the most probable number. Determination of coliform bacteria, fecal coliforms and <i>Escherichia coli</i> by the technique of multiple tube dilutions.	CCAYAC-M-344/0 Test method for the microbiological analysis of sea water from growing areas of Shellfish	LESP Baja California LESP Baja California Sur ANDA LESP Sonora LESP Sinaloa	LESP Baja California LESP Baja California Sur LESP Sonora
Coliformes Fecales de plantas de tratamiento con UV	Total Coliform Other Multiple Tube Fermentation Methods. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environmental Federation. 1992. Section 9221. Examination of a 100 ml aliquot by the Multiple Tube Fermentation Method (MTF). Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th Edition, APHA/AWWA/WEF. Washington, D.C.	CCAYAC-M-354/0 Método de Prueba para el análisis microbiológico de agua de mar tratada con UV	LESP Baja California	LESP Baja California

5.3.3. MICROBIOLOGICAL TESTS IN PRODUCT

Microbiological analysis of product	MSSP Method	MSSP/NSSP Method	MSSP Laboratories	MSSP/NSSP Laboratories
<i>V. parahaemolyticus</i> . ⁵	Test Method for the quantification of toxigenic <i>Vibrio parahaemolyticus</i> tdh and trh by MPN and real-time PCR in samples of Shellfish. CCAYAC-M-342		Under implementation	Under implementation
Salmonella	<i>Mexican Official Standard NOM-242-SSA1-2009, Products and services. Fishery products fresh, chilled, frozen and processed. Sanitary Specifications and test methods. B. 14 Method for the determination of Salmonella in food.</i>		See list of authorized third party laboratories will be revoked on 17 December 2016	Does not apply
	<i>Mexican Official Standard NOM-210-SSA1-2014, products and services. Microbiological test methods. Determination of indicator microorganisms. Determination of pathogenic microorganisms. Appendix A Normative. Reference method for the isolation of Salmonella spp.</i>		Will enter into force from 17 December 2016.	Does not apply
<i>V. cholerae</i>	<i>Mexican Official Standard NOM-242-SSA1-2009, Products and services. Fishery products fresh, chilled, frozen and processed. Sanitary Specifications and test methods. B. 19. Techniques and Procedures for the investigation of Vibrio cholerae</i>		See list of authorized third party laboratories.	Does not apply

⁵ As indicated in the Risk assessment and Control Plan of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters that are exported to the US.

Microbiological analysis of product	MSSP Method	MSSP/NSSP Method	MSSP Laboratories	MSSP/NSSP Laboratories
<i>E. coli</i>	NOM-242-SSA1-2009, Products and services. Fishery products fresh, chilled, frozen and processed. Sanitary Specifications and test methods. Appendix B Normative. Estimation of microbial density by the technique of the most probable number. Determination of coliform bacteria, fecal coliforms and <i>Escherichia coli</i> by the technique of multiple tube dilutions.		See list of authorized third party laboratories. In force until 17 September 2016.	Does not apply
	Appendix H Normative. Approved Method for the estimation of the density of total and fecal coliforms, and <i>E. coli</i> by the technique of the MPN present in samples of food for human consumption and water.		Will enter into force from 17 September 2016.	Does not apply

5.4. REPORT OF RESULTS

The result must be sent immediately to the customer (who requested the analysis) through email or any other means that facilitates the reception of data.

For the areas that are exporting products to the United States of America, only the [approved laboratories](#) for this purpose can generate results.

The report of results must be composed of the following documents, official letter of request (when applicable), field sheet, sheet of analytical work and if requested by the quality management system of each Laboratory, reports of results will be annexed, which shall contain the following information:

- Harvesting Area
- Start Date and time of sampling
- Number of samples
- Start Time of sampling
- Temperature at the beginning of sampling
- Date and time of completion of sampling
- Date and time of reception of samples in CCAYAC
- Tests carried out
- Method used
- Specification
- Result obtained
- Comments regarding the sample (when applicable)

- Elapsed time from sampling to the reception of the sample.
- Elapsed time from sampling to the issuance of the report of results.

All the reports of results must be sent in copy to the following officials of COFEPRIS:

- Álvaro Israel Pérez Vega, Commissioner for Sanitary Enforcement aiperez@cofepris.gob.mx
- Imelda Rocío Guzmán Cervantes, Executive Director of Analytical Control irguzman@cofepris.gob.mx
- Pamela Suarez, Executive Director of Special Programs psuarez@cofepris.gob.mx
- Jose Alejandro Barreiro Isabel, MSSP Coordinator jabarreiro@cofepris.gob.mx
- Mario Castillo Chávez mcastilloc@cofepris.gob.mx
- Luis Ignacio Sánchez Córdoba lisanchez@cofepris.gob.mx
- César Omar Gálvez González, Coordinator of Analytical Projects Coordinator cgalvez@cofepris.gob.mx
- Coordinación de laboratorios pmsmb.ccayac@gmail.com
- Control analítico controlanalitico@cofepris.gob.mx

6. BIBLIOGRAPHY

Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish. Fourth Edition 1970. American Public Health Association. 1740 New York, N.Y. 10019.

Método modificado: John Wekell, Michael Quilliam, y James Hungerford, *Domoic Acid in Unsalted Fresh or Frozen Shellfish Methanol-Water Extraction LC Method.*

Evaluación del Oficial de FDA Chandler, Linda A. mayo 2005. La última evaluación por las Oficiales de FDA Chandler, Linda A y Melissa Evans fue en mayo de 2013, como se presenta en la versión CCAYAC-M-001/10

Most Probable Number, Bacteriological Analytical Manual, 8th Edition, 2001 revision. Chapter 9, Section D.2. a through d. [<http://vm.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>]

Identification of Vibrio vulnificus by DNA probe. Wright, A.C. et al. 1993. *Rapid identification of Vibrio vulnificus on nonselective media with an alkaline phosphatase-labeled oligonucleotide probe.* Appl. Environ. Micro. 59:541-546.

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods Vibrio, Chapter 40 Kaysner, C.A. & A. De Paola. 2001., In: 4th edition, F.R. Downer & K. Ito, Edts., American Public Health Association, Washington, D.C.

Asociación Americana de Salud Pública. 1985. Métodos Estándar para el Análisis de Aguas y Aguas Residuales. 16a Ed. *American Public Health Association, American Water Works Association, Agua Federación de Control de la Contaminación.* Washington DC.

Food and Drugs Administration. 1994. Procedimientos normalizados para o Moluscos (Laboratorio de Evaluación del Estado Oficiales. Administración de Alimentos y Drogas, Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada de la Oficina de Programas de Campo de la División de Programas Cooperativos, Rama Seguridad mariscos (idem), Washington, DC

Manual of Clinical Microbiology Balows, A., W.J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H.D. Isenberg and H. J. Shadomy, editor. 1991., 5th edition. *American Society of Microbiology*, Washington, D.C.

NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.

National Shellfish Sanitation Program (NSSP) Guide for the Control of Molluscan Shellfish 2013 Revision

US Harmonized Standard Operating Procedure for detection of Lipophilic toxins by Mouse Bioassay

http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/COMISIÓN%20DE%20OPERACIÓN%20SANITARIA_Documentos%20para%20publicar%20en%20la%20sección%20de%20MEDICAMENTOS/MB%20y%20PP/VpPlan.pdf