

# CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION



Food and Agriculture  
Organization of  
the United Nations



World Health  
Organization

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy - Tel: (+39) 06 57051 - Fax: (+39) 06 5705 4593 - E-mail: [codex@fao.org](mailto:codex@fao.org) - [www.codexalimentarius.org](http://www.codexalimentarius.org)

Agenda Item 2

MAS/36 CRD/5  
Original Language Only

## JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX COMMITTEE ON METHODS OF ANALYSIS AND SAMPLING

36<sup>th</sup> Session

Budapest, Hungary, 23 – 27 February 2015

MATTERS REFERRED TO THE COMMITTEE

*(Comments of Argentina, Belize, Chile, Costa Rica, Cuba, El Salvador, EU, Kenya, Peru and Uruguay)*

### Part A. Decisions of the 37th session of the Commission Related to the Work of the Committee

#### Methods for Determination of Marine Biotoxins

#### ARGENTINA

#### (ENGLISH)

Argentina thanks the Committee for the opportunity to present its observations relative to the Draft of Performance Criteria for the Reference and Confirmation Methods for Marine Biotoxins (Section 1.8.6 Determination of Biotoxins) of the Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs.

During the 33<sup>rd</sup> CCFFP session, unanimous consensus was reached in relation to the criteria for the determination of biotoxins and it was agreed to send the Draft to the 37<sup>th</sup> session of the Commission for its adoption at Step 8 and to CCMAS for its endorsement.

However, the 35<sup>th</sup> session of CCMAS, according to available records, classified the bioassay in mice as a type IV method. This classification would prevent this method from being used for purposes of control, inspection and regulation in situations of analytical dispute, which has caused concern among several Member countries that have historically used the **959.08 AOAC Official method of bioassay in mice (MBA)** in programs of monitoring and surveillance for purposes of control, inspection and regulation with appropriate public health protection.

Subsequently, in July 2014, the 37<sup>th</sup> session of the Commission adopted section I- 8.6.1 on chemical methods for the detection of biotoxins in bivalve molluscs and

- i. returned the biological and functional methods to determine paralytic shellfish toxicity to CCMAS with a request to review the typing of the methods in question and encouraged Members to submit information in order for CCMAS to take a decision on this matter
- ii. encouraged CCMAS to proceed rapidly with its discussion on the way to deal with biological methods from a criteria approach perspective

In view of the above and according to the presentation made by Chile on this subject, Argentina wishes to propose the following:

#### General Comment

#### Position

Argentina endorses the position presented by Chile's Delegation referred to the need to re categorize the **AOAC 959.08 Method – PARALYTIC SHELFISH POISON – BIOLOGICAL METHOD**, currently categorized as TYPE IV, in the **TYPE III** category and presents the following analytical background based on collection of data produced by the laboratories of the General Direction of Laboratories and Technical Control –

DLA – APAC Coordination and Mar del Plata Regional Laboratory, both belonging to the National Service of Health and Agro-Food Quality (SENASA) that systematically perform this control since 1980.

### **Background**

The marine biotoxins in shellfish are generated by Harmful Algae Flowerings (HAF), being the Paralytic Shellfish Poison (PSP) or SAXITOXINS (STX) one of the marine toxins groups submitted to control for its capacity to affect the central nervous system and produce the death of a person poisoned by intake of contaminated products (bivalve molluscs, gastropods).

### **Legal Standard**

The Argentine Alimentary Codex (AAC), article 276, numeral I, of Chapter VI (Meat and related Feed): "It will be considered inadequate for consumption (Res. 101 of 22.02.93); the bivalve shellfish and gastropods that contain a level of Paralytic Toxin higher than 400 Mouse Units/100 g of wet pulp ((80 micrograms of Toxin/100 g of wet pulp), determined using the Sommer and Meyer bioassay technique (AOAC. 14<sup>o</sup> Ed. 18.086 a 18.092)".

The Inspection Ruling for Products, Byproducts and Derivatives of Animal Origin (Decree 4238/68), in its Chapter XXIII, Fishery Products, under the Numeral 23.12.8, point (O) (Acceptability Limit of Paralytic Toxin in bivalves and gastropods: 400 UR/100g), and the numeral 23.24.37 point (e), that indicates that the MPT concentration should not exceed 80 µg for each 100g of whole shellfish or of any part edible separately.

### **Performance Criteria Of The Method**

The performance criteria have been evaluated:

- WORK RANGE
- DETECTION LIMIT (LOD)
- QUANTIFICATION LIMIT (LOQ)
- REPEATABILITY (INTRALAB)
- REPRODUCIBILITY (INTERLAB)
- % OF RECUPERATION
- PRACTICABILITY AND APPLICABILITY

Also have been assessed from historic data:

MINIMUM QUANTIFIABLE LETHAL CONCENTRATION (MQLC).

In the following TABLE the values of the previously mentioned parameters are shown:

PARAMETER	DEFINITION	ASSESSMENT	VALUES
<b>METHOD</b>	DETERMINATION OF MARINE PARALYTIC SHELLFISH POISON OF RAW AND LIVE BIVALVE SHELLFISH		
<b>REFERENCE</b>	AOAC 959.08 - PARALYTIC SHELLFISH POISON – BIOLOGICAL METHOD		
<b>MOUSE UNIT (MU)</b>	Is the quantity of STX that causes death of a 20 g mouse in 15 minutes	It is calculated based on the Sommer's Table, which relates time of death (TD) and Mouse Units (MU) corrected by weight.	
<b>CONVERSION FACTOR (CF)</b>	Are the equivalent ug of STX by Mouse Unit (corrected)	CF= Concentration of STX (ug/ml) / MU (corrected)	Average Value: 0.20 Range 0.16 -0.24
<b>TIME OF DEATH (TD)</b>	Elapsed time between the end of the inoculation and the mouse last breath (dying gasp).		The Median falls between 5-7 minutes

PARAMETER	DEFINITION	ASSESSMENT	VALUES
<b>MAXIMUM LIMIT PERMITTED (MLP)</b>	Is the sample concentration expressed as ug STX/100 g de wet pulp of bivalve shellfish and gastropods beyond which the product is not suitable for human consumption		The MLP is 80 ug STX Eq/100g of wet bivalve shellfish and gastropods pulp.
<b>WORK RANGE</b>	Work concentration interval defined by the MLP and the method's sensibility.		0,34 -0, 67 ug/ml of STX
<b>DETECCIÓN LIMIT (LOD)</b>	Is the minor concentration of STX in one sample that should be detected, but not necessarily quantified under trial conditions. It is experimentally determined.	It is considered that the use of this parameter is adequate to define an instrumental method, but it is <b>not applicable to this type of method.</b>	

PARAMETER	DEFINITION	ASSESSMENT	VALUES
<p><b>QUANTIFICACIÓN LÍMIT (LOQ)</b></p>	<p>Is the Lowest Concentration of toxin that is determined with acceptable precision under the trial conditions. An LOQ is experimentally estimated considering the corrections for Mouse Weight (MW), Time of Death (TD) Conversion Factor (CF).</p>		<p>Experimental quantification limit: 40 ug equivalent of STX/100g bivalve shellfish and gastropods wet pulp.</p>
<p><b>REPEATABILITY (INTRALAB)</b></p>	<p><b>Precision</b> obtained applying the same procedure, on the same sample, with the same operator, in short intervals of time, using the same equipment, inside the same laboratory.</p>	<p>In <b>biological methods cannot be estimated</b> because the instrument is a mouse and it can only be used for one analysis.</p>	

PARAMETER	DEFINITION	ASSESSMENT	VALUES
<b>REPRODUCIBILITY (INTERLAB)</b>	<b>Precision</b> obtained applying one same procedure, on one same sample, in different laboratories, with different operators.	It is estimated from the results of inter laboratory trial rounds and number of participating laboratories (N). It is calculated as: VC% (RSDR%) and CV % Horwitz (RSDRh%)	Lower than 35%
<b>RECUPERACIÓN (%)</b>	Is the relation between the obtained STX concentration and the assigned value.	It is estimated from the inter laboratory trial data and is calculated as follows: $\%R = (\text{found STX concentration} / \text{assigned value}) * 100$	65 a 115 %

PARAMETER	DEFINITION	ASSESSMENT	VALUES
<b>PRACTICABILITY AND APPLICABILITY</b>	The history of the method's use shows that it complies with the applicability y practicability criteria established in the CODEX ALIMENTARIUS Procedure Handbook.		

Other criteria that can be used

PARAMETER	DEFINITION / ASSESSMENT	VALUES
<b>MINIMUM QUANTIFIABLE LETHAL CONCENTRATION (MQLC)</b>	Minimum Quantifiable Lethal Concentration result that can be obtained considering a death median of 60 minutes, the smallest mouth weight that is regularly used in the laboratory, the CF and the analyst. Is the minimum concentration that can be quantified by the bioassay.	Range 29 a 37 ug equivalent of STX/100g of bivalve shellfish and gastropods wet pulp.

## Conclusions

According to the assessed background, it is possible to conclude that:

- a. The analytical parameter values assessed support the request for the method's categorization as Type III Codex Method.
- b. The quantification limit is far below the legal limit, fact that ensures the adequate protection of the public health.
- c. As for the applicability y practicability, this method is the chosen method in countries such as Brazil, Colombia, Costa Rica, Chile, United States, Uruguay, Mexico, Perú, El Salvador, in addition to Argentina, according to the CCLAC search.

## References

- AOAC Official Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison Biological Method J. AOAC International 2005. 49.10.01.
- Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Method. Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins ([www.aesa.msc.es](http://www.aesa.msc.es)).

## (SPANISH)

Argentina agradece al Comité la oportunidad de presentar sus observaciones respecto al Proyecto de Criterios de Rendimiento para los Métodos de Referencia y Confirmación para Biotoxinas Marinas (Sección I.8.6 Determinación de Biotoxinas) de la Norma para los Moluscos Bivalvos Vivos y los Moluscos Bivalvos Crudos.

Durante la 33ª sesión del CCFFP, se alcanzó el consenso en relación a los criterios para la determinación de biotoxinas y se acordó remitir el Anteproyecto al 37º período de Sesiones de la Comisión para su adopción en el Trámite 8 y al CCMAS para su adopción-

Sin embargo, en la 35º sesión del CCMAS en acuerdo a antecedentes disponibles se clasifico el bioensayo en ratones como método del Tipo IV. Esta clasificación impediría utilizar este método para fines de control, inspección y regulación en situaciones de controversia analítica, hecho que ha causado preocupación en diversos países Miembros que históricamente han utilizado el Método Oficial AOAC 959.08 de Bioensayo en Ratón (MBA) en programas de monitoreo y vigilancia para fines de control, inspección o reglamentación con adecuado resguardo de la Salud Pública.

Posteriormente, en julio de 2014, durante su 37º período de Sesiones, la Comisión aprobó la Sección I-8.6.1. relativa a los métodos químicos para la detección de biotoxinas en moluscos bivalvos y i) devolvió al CCMAS los métodos biológicos y funcionales para determinar las toxinas paralizantes de los moluscos y le pidió que examinara la tipificación de los métodos en cuestión; alentó además a los Miembros a presentar información a fin de que el CCMAS tomara una decisión al respecto y ii) alentó al CCMAS a examinar sin demora la manera de abordar los métodos biológicos desde la perspectiva de un enfoque basado en criterios

En virtud de ello y atendiendo a la presentación realizada por Chile sobre este tema, Argentina desea plantear lo siguiente:

### Comentario General

**Argentina apoya la posición presentada por la Delegación de Chile respecto a la necesidad de recategorizar el Método el AOAC 959.08 - PARALYTIC SHELFISH POISON –BIOLOGIC METHOD**, actualmente categorizado como TIPO IV, **en la categoría TIPO III** y presenta los siguientes antecedentes analíticos nacionales en base al relevamiento de datos producidos por los laboratorios de la Dirección General de Laboratorios y Control Técnico – DLA – Coordinación APAC y Laboratorio Regional Mar del Plata ambos pertenecientes al Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) que realizan sistemáticamente este control desde el año 1980.

### Antecedentes

Las BIOTOXINAS MARINAS en mariscos son generadas por Floraciones Algales Nocivas (FAN) siendo la Toxina paralizante de moluscos (TPM) o SAXITOXINAS (STX) uno de los grupos de toxinas marinas sometidos



a control por su capacidad de afectar el sistema nervioso central y producir la muerte de la persona intoxicada por ingestión de productos contaminados (moluscos bivalvos, gasterópodos).

### **Normativa Legal**

El Código Alimentario Argentino (CAA), artículo 276, numeral i, del Capítulo VI (Alimentos cárneos y afines): "Será considerado inepto para la alimentación (Res 101 del 22.02.93): "Los moluscos bivalvos y gasterópodos que contengan un nivel de Toxina Paralizante de Moluscos superior a las 400 Unidades Ratón/100 g de pulpa húmeda (80 microgramos de Toxina/100 g de pulpa húmeda), determinado utilizando la técnica del bioensayo de Sommer y Meyer (AOAC. 14º Ed. 18.086 a 18.092)".

El Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de Origen Animal (Decreto 4238/68), en su Capítulo XXIII, Productos de la Pesca, bajo el Numeral 23.12.8, inciso (O) (Límite de aceptabilidad de Toxina Paralizante en bivalvos y gasterópodos: 400 UR/100g), y el numeral 23.24.3.7 inciso (e), que indica que la concentración de TPM no deberá sobrepasar los 80 µg cada 100g de molusco entero o de cualquier parte comestible por separado

### **Criterios De Desempeño Del Método**

Se han evaluado los criterios de desempeño

- RANGO DE TRABAJO
- LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)
- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)
- REPETIBILIDAD (INTRALAB)
- REPRODUCIBILIDAD (INTERLAB)
- % DE RECUPERACIÓN
- PRACTICABILIDAD Y APLICABILIDAD

Habiéndose calculado también a partir de los datos históricos:

- CONCENTRACION LETAL MÍNIMA CUANTIFICABLE (CMLC)

En el siguiente cuadro se consignan los valores de los parámetros antes mencionados

PARAMETRO	DEFINICION	CALCULO	VALORES
<b>METODO</b>	DETERMINACIÓN DE TOXINAS MARI- NAS PARAZALIZANTES DE MOLUS- COS BIVALVOS CRUDOS Y VIVOS	.	
<b>REFERENCIA</b>	AOAC 959.08 - PARALYTIC SHELFISH POISON -METODO BIOLOGICO		
<b>UNIDAD DE RATÓN UR</b>	Es la cantidad de STX que provoca la muerte de un ratón de 20 g en 15 minutos.	Se calcula en base a la Tabla de Sommer en la que se relaciona tiempos de muerte (TM) y Unidades de Ratón (UR) corregida por peso.	
<b>FACTOR DE CONVERSION (FC)</b>	Son los ug equivalentes de STX por Unidad Ratón (corregida)	$FC = \frac{\text{Concentración de STX (ug/ml)}}{\text{UR (corregida)}}$	Valor promedio : 0.20 Rango 0.16 -0.24
<b>TIEMPO DE MUERTE (TM)</b>	Tiempo transcurrido entre el final de la inoculación y la última respiración (boqueo) del ratón.		La Mediana está comprendida entre 5- 7 minutos

PARAMETRO	DEFINICION	CALCULO	VALORES
<b>LIMITE MAXIMO PERMITIDO (LMP)</b>	Es la concentración de la muestra expresada como ug STX/100 g de pulpa húmeda de moluscos bivalvos y gasterópodos por encima de la cual el producto es no apto para consumo humano		El Límite Máximo Permitido (LMP) es de 80 ug STX Eq/100g de pulpa húmeda de moluscos bivalvos y gasterópodos.
<b>RANGO DE TRABAJO</b>	Intervalo de concentraciones de trabajo definidas por el nivel máximo permitido y la sensibilidad del método.		0,34 -0, 67 ug/ml de STX
<b>LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)</b>	Es la menor concentración de STX en una muestra que debe ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones del ensayo. Se determina experimental mente.	Se considera que el uso de este parámetro es adecuado para definir un método instrumental pero <b>no es aplicable a este tipo de método.</b>	

PARAMETRO	DEFINICION	CALCULO	VALORES
<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)</b>	Es la menor concentración de toxina que se determina con una precisión aceptable bajo las condiciones del ensayo. Se estima un LOQ en forma experimental considerando las correcciones del Peso del Ratón, Tiempo de Muerte (TM) , Factor de conversión (FC)		Límite de cuantificación experimental: 40 ug equivalentes de STX/100g de pulpa húmeda de moluscos bivalvos y gasterópodos
<b>REPETIBILIDAD (INTRALAB)</b>	<b>Precisión</b> obtenida aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, con el mismo operador, en intervalos cortos de tiempo, utilizando el mismo equipamiento, dentro de un mismo laboratorio	En <b>métodos biológicos no puede ser estimada</b> porque el instrumento es un ratón y este se usa para un solo análisis.	

PARAMETRO	DEFINICION	CALCULO	VALORES
<b>REPRODUCIBILIDAD (INTERLAB)</b>	<b>Precisión</b> obtenida aplicando un mismo procedimiento, sobre una misma muestra, en diferentes laboratorios, distintos operadores.	Se estima a partir de los resultados de rondas de ensayos interlaboratorio y número de laboratorios participantes (N). Se calcula como: CV% (RSDR%) y CV% Horwitz (RSDRh%)	menor al 35%
<b>% DE RECUPERACIÓN</b>	Es la relación entre la concentración de STX obtenida y el valor asignado..	Se estima a partir datos de ensayos interlaboratorios y se calcula según $\%R = (\text{concentración de STX hallada} / \text{valor asignado}) * 100$	65 a 115 %

PARAMETRO	DEFINICION	CALCULO	VALORES
<b>PRACTICABILIDAD Y APLICABILIDAD</b>	El historial de uso del Método demuestra que cumple con los criterios de aplicabilidad y practicabilidad establecidos en el Manual de Procedimientos del CODEX ALIMENTARIUS		

Otro criterio que puede utilizarse

PARAMETRO	DEFINICION / CALCULO	VALORES
<b>CONCENTRACION LETAL MÍNIMA CUANTIFICABLE (CMLC)</b>	Concentración Letal Mínima Cuantificable obtenida considerando una mediana de muerte de 60 minutos, el peso del ratón mas pequeño que habitualmente usa el laboratorio, el FC y el analista. Es la mínima concentración que puede ser cuantificada por el bioensayo.	Rango 29 a 37 ug equivalentes de STX/100g de pulpa húmeda de moluscos bivalvos y gasterópodos

## Conclusiones

De acuerdo a los antecedentes evaluados, es posible concluir que:

- d. Los valores de los parámetros analíticos evaluados permiten sustentar la solicitud de categorización del método como Método Codex Tipo III.
- e. El límite de cuantificación se encuentra muy por debajo del límite legal hecho que asegura la adecuada protección de la salud pública.
- f. En cuanto a la aplicabilidad y practicabilidad este método es el método de elección en países como Brasil, Colombia, Costa Rica, Chile, Estados Unidos, Uruguay, México, Perú y El Salvador, además de Argentina según el relevamiento realizado por CCLAC.

## Referencias

- AOAC Official Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison Biological Method J. AOAC International 2005. 49.10.01.
- Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Method. Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins ([www.aesa.msc.es](http://www.aesa.msc.es)).

## **EL SALVADOR**

En seguimiento al documento CAC/37 CRD/07, enviado por El Salvador y a partir de la manifestación de preocupaciones en el 37 Periodo de sesiones del CAC, sobre la clasificación del bioensayo en ratones como tipo IV, El Salvador nuevamente desea expresar que no otorga respaldo a la clasificación del Método bioensayo en ratones como tipo IV.

En El Salvador se aplica actualmente el Bioensayo en ratón por la Autoridad competente como método de Tipo III, considerando a la vez su practicabilidad, aplicabilidad y bajo costo en relación a métodos químicos y es eficiente ya que proporciona una protección adecuada de la salud humana y además el método se utiliza para fines de control, inspección y regulación dentro del país y otros que lo utilizan.

Se apoya el documento elaborado por Chile, Belice, Costa Rica, Cuba, Perú y Uruguay, en el que se dan a conocer antecedentes y resultados de Criterios de desempeño del método bioensayo en ratón.

El Salvador apoya la clasificación del método AOAC 959.08 como tipo III, no como tipo I.

## **EUROPEAN UNION**

The European Union (EU) strongly supports the classification of the methods for determination of marine biotoxins endorsed by CCMAS35.

The EU sees no justification to reconsider the classification of the mouse bioassay (MBA). Indeed, the typing of the methods in question was done in accordance with the provisions of the Procedural Manual (*Principles for the establishment of Codex methods of analysis*).

The EU looks forward to a fruitful discussion in CCMAS36 to develop objective criteria for biological methods.

## **CHILE, BELIZE, COSTA RICA, CUBA, PERU and URUGUAY**

### **(ENGLISH)**

Chile Belize, Costa Rica, Cuba, Peru y Uruguay, thanks the members of the Committee for the opportunity to present on this document our observations and contributions regarding the Performance Criteria for Methods for the Determination of Marine Biotoxins (Section I-8.6) in the Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs.

During the 33th CCFFP meeting, a consensus has been reached in relation to the performance criteria for methods for the determination of marine biotoxins and the Committee recommended its endorsement by the Commission in the following 37<sup>th</sup> CAC meeting.

Two weeks later, during the 35<sup>th</sup> CCMAS meeting, in the Section I-8.6 of Appendix II, the mouse bioassay (AOAC 959.08) for the determination of saxitoxins or paralytic toxins, was typified as Type IV. Nonetheless, in several countries the mouse bioassay is used for more than 50 years as a mean for control, inspection and regulatory purposes.

To address this situation, Chile proposed that the Commission should return section I-8.6.2 to CCMAS with a request to review the typing of the methods in question. The latter request was supported by several different countries that shared this concern. The Commission adopted Section I-8.6.1 but returned Section I-8.6.2 to CCMAS for the reexamination of its typing and encouraged Members to submit information in order for CCMAS to take a decision on this matter.

Considering this situation and the document CX/FH 15/36/2, sent on December 2014, “Decisions of the 37th Session of the Commission related to the work of the Committee”, in the title “Standards and Related Texts adopted”, in the part “Methods for determination of marine biotoxins”; Chile evaluated the information available on the **Official Method AOAC 959.08**, regarding its typing, as shown in the following paragraphs.

### Introduction

Marine biotoxins are generated by harmful algal blooms (HABs) which are a dynamic phenomenon, characterized with frequent changes in the zones affected, spatial distribution, stratification, microalgae concentration, intracellular concentration and toxin composition (Suárez - Isla y Guzmán, 1999).

The group of toxins that has been described with higher frequency and/or have the largest impact on public health, especially on the South American Cone, belongs to the saxitoxin or Paralytic Shellfish Toxin (PST) group. (Lagos y cols. 2002, Guzmán y cols. 2002, Suárez-Isla y cols, 2002).

The PSTs belongs to a group of hydro soluble neurotoxins that are highly thermostable and affects the Central Nervous System and causes muscle paralysis which in turn may cause death. People who are intoxicated with this group of toxins have a high probability of dying. Considering this, the control and surveillance programs must use methodologies that complies with the objectives of protecting the public health of the consumers who are exposed to these hazards.

For this purpose, the Official Method AOAC 959.08, Mouse Bioassay (MBA), has been used for more than 50 years by several different countries as a reference method, for control, inspection and regulatory purposes. This method has the adequate specificity to determine the toxicity of the saxitoxins, with a broad security range, allowing to maintain effective and safe public policies. It is noteworthy that this method was used in the study for the determination of the Toxic Equivalency Factor (TEF) for saxitoxin analogous marine biotoxins and based on this, the quantification of the congeners of saxitoxin determined by chromatographic methods developed later, allowing the expression on saxitoxin equivalent units (STXeq).

According to general criteria of analysis method of the Procedural Manual of the Codex Commission, this official method was approved by the AOAC and the information on its performance, provide solid proof about its accuracy and precision, as well as its feasibility.

Among the countries that currently use this method are, Argentina, Brazil, Colombia, Costa Rica, Chile, United States, Uruguay, Mexico, Perú and El Salvador. Republica Dominicana, Trinidad and Tobago and Cuba, are currently assessing its implementation for controlling imports from countries affected with PSTs, due to its low costs.

### Evaluation results

According to the evaluation on the performance of Official Method AOAC 959.08 in 11 official laboratories in Chile since the year 2000, we conclude that this method **has the necessary attributes to accomplish the established objective**, which is the determination of toxicity of paralytic toxins in seafood (bivalve molluscs,



gastropods and tunicates). The maximum limit permitted (MLP) in Chile and internationally is 80 µg STXeq/100g (namely, 800 µg STXeq/ kg) of tissue.

In relation of the performance criteria, several information was collected regarding the Limit of Quantification, Recovery and Precision, which are presented now.

### 1. Limit of Quantification (LOQ)

According to the document: “*Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins Biological Methods*” of the Marine Biotoxin Reference Laboratory; “the detection limit is studied inoculating different standard dilutions of low toxin concentration and observing the symptoms”.

As the measure indicated by the Official Method AOAC 959.08 requires to determine the time of death of the animal, rather than its symptoms, determining the LOD do not have practicability considering the objective.

In relation to the LOQ, the cited document says that the theoretical limit of quantification (LOQ) is of 16,92 µg STXeq/100g (169,2 µg STXeq/kg) and also indicates that this limit has to be confirmed experimentally.

According to the document: “EFSA-Q-2006-065E: *Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain*”, the MBA method has a detection/quantification limit of 280-402 µg STXeq/kg.

For LOQ determination, four Chilean laboratories have established experimentally a Minimum Quantifiable Lethal Concentration (MQLC), considering a death time equivalent to the maximum according to Sommer’s table (60 minutes), the lowest mouse weight in use and the Conversion Factor (CF) of the laboratory. The mouse weight and death time are converted to corrected mouse unit and then obtaining the result using the toxicity formulae. Results are shown in Table 1.

Table 1: Minimum Quantifiable Lethal Concentration (MQLC), by laboratory.

Laboratory	Year	MQLC (µg STXeq/100 g)
Laboratorio de Toxinas Marinas Sede Santiago, Universidad de Chile	2002	26,0
	2003	28,0
	2004	29,5
	2005	31,0
	2006	27,0
	2007	28,0
	2008	26,3
	2009	28,0
Laboratorio de Toxinas Marinas Sede Castro, Universidad de Chile	2006	28,3
	2007	27,4
	2008	29,1
	2009	25,4
	2010	25,4

	2011	25,4
	2012	28,3
	2013	25,7
	2014	25,7
Public Health Institute of Chile - Laboratorio Nacional de Referencia Ministerio de Salud de Chile	2013	32,0
Laboratorio Secretaría Ministerial de Salud de Región de Magallanes y Antártica Chilena	2013	27,4

Source: Report, Evaluation of performance of the Official Method (AOAC 959.08) in Chilean Laboratories – Chilean Food Quality and Safety Agency (ACHIPIA) 2014.

It is seen that the LOQ value obtained is higher than the value indicated in “*Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Methods*”, and it is in the range of **25,4 - 32,0 µg STX eq/100 g**. These values are significantly lower than the MLP established, so there is an important safety range from the perspective of protecting public health.

## 2. Recovery

For this purpose, data was evaluated from 2008, obtained from several rounds of proficiency tests (PEEC, acronym in Spanish), organized by the Public Health Institute of Chile, which is the reference laboratory of the Chilean Ministry of Health and the Metrology Institute. The results are shown in Table 2:

Table 2: Recovery percentages obtained by the PEEC proficiency tests

Year	Nº of laboratories	Assigned value µg STXeq/100 g	Percentage of Minimum recovery obtained	Percentage of Maximum recovery obtained
2008	13	81,9	100	120
2009	14	81,9	80	111
2010	11	126,6	77	115
2011	9	256,6	83	114
2012	15	553,0	71	107
2013	12	519,6	79	118

Source: Report, Evaluation of the Results of Inter laboratory Testing of Paralytic Shellfish Toxins Analysis organized by the Public Health Institute of Chile.

Although the guidelines to establish numerical values related to the criteria established by CCMAS, are focused on instrumental chemical methods according to the Procedural Manual; in this case, this particular biological method has a recovery rate of 71%-120% (table 2) which can be positively compared with the guidelines

proposed by CCMAS, which for an evaluation concentration of interest of 100 µg/kg, the recovery rate allowed is of 80%-110%, for individual analytes.

As a comparison, the “Performance Criteria for Methods for the Determination of Marine Biotoxins (Section I-8.6) in the Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs”, indicates acceptability range for recovery of 50%-130% for chromatographic methods (AOAC 2005.06, NMKL 182:2005, EN 14526:2004, AOAC 2011.02 and NMKL 197:2013, formalized by Codex for PSTs during 2014) .

### 3. Precision

The document *Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Methods* indicates that repeatability in this biological method cannot be estimated since the measuring instrument is a mouse, which can only be used once. However, Chile considers necessary to determine the Inter laboratory reproducibility, based on proficiency testing rounds.

Table 3: Statistical summary of the results of the participants regarding the assigned value

Year	Assigned value of testing Item $\mu$	Obtained results			Units
		Median	Robust Average	MAD (Average Absolute Deviation)	
2008	81,9	91	91,9	4,5	$\mu\text{g}$ STXeq/100g
2009	81,7	85,5	82,9	4,7	$\mu\text{g}$ STXeq/100g
2010	126,6	127	125,2	11,74	$\mu\text{g}$ STXeq/100g
2011	256,6	228	247,9	15	$\mu\text{g}$ STXeq/100g
2012	553,0	506,5	507,9	43,5	$\mu\text{g}$ STXeq/100g
2013	519,6	519,2	517,3	27,0	$\mu\text{g}$ STXeq/100g

Source: Report, Evaluation of the Results of Inter laboratory Testing of Paralytic Shellfish Toxin Analysis organized by the Public Health Institute of Chile; Chilean Ministry of Health. The number of participant laboratories is the same as the indicated in Table N°2

Table 4: Related Standard deviations in inter laboratory rounds of PEEC-SP6 Paralytic shellfish Poison per year, from 2008 to 2013.

Year	Assigned value of testing Item $\mu\text{gSTXeq}/100\text{g}$	$RSD_R\%$	Horwitz $RSD_{Rh}\%$
2008	81,9	4,8%	16,5%
2009	81,7	5,7%	16,5%
2010	126,6	9,4%	15,4%
2011	256,6	6,1%	13,9%
2012	553,0	8,6%	12,4%
2013	519,6	5,2%	12,5%

Source: Report, Evaluation of the Results of Inter laboratory Testing of Paralytic Shellfish Toxin Analysis organized by the Public Health Institute of Chile; Chilean Ministry of Health

It is seen that the percent relative standard deviations of inter laboratories ( $RSD_R\%$ ) are lower than the Horwitz value for the studied level, which proves that the method is accurate at the studied levels.

It is important to emphasize that the reproducibility obtained exceeds in at least a half the reported or predicted one by AOAC for this method. In connection with the chromatographic methods AOAC 2005.06, NMKL 182:2005, EN 14526:2004, AOAC 2011.02 and NMKL 197:2013, the criteria for this parameter made official by Codex were <44%.

It must be emphasized that in 20 years of official control of export products susceptible to paralytic shellfish toxins, alerts have been not informed abroad for this type of toxins.

## Conclusions

According to the evaluated backgrounds, it is possible to conclude that:

- Values of LOQ obtained provide an appropriate safety margin.
- Regarding Recovery evaluation, the values obtained in the investigation vary from 71 to 120%, which is considered acceptable according to the range established by Codex for AOAC 2005.06, NMKL 182:2005, EN 14526:2004, AOAC 2011.02 and NMKL 197:2013 chromatographic methods, as indicated in section I-8.6.1 of the Standard for Live and Raw Bivalve Molluscs.
- Inter laboratory precision is demonstrated since it holds that relative standard deviations are lower than the recommended Horwitz's value for the concentration levels studied.
- The practicability and applicability of this method have allowed its application in several countries as a reference method, as well as for control and inspection controls.

The evidence obtained shows that the official AOAC 959.08 method **meets the requirements for the expected objective**, the determination of toxicity of paralytic shellfish toxins in seafood according to the maximum limit

permitted globally of 80 µg STX eq/100g of mollusc and thus its use for control, inspection or regulation purposes is valid.

Minimum applicable interval (µg STX eq/100 g)	LOQ (µg STXeq/100 g)	Precision (RSD <sub>R</sub> %)	Recovery percentage (%R)
50 -150	30	<44%	70-120

Based on the backgrounds, Chile considers that the analytical performance of the AOAC 959.08 method is appropriate regarding precision, accuracy, applicability range, practicability and record of human's health protection. These backgrounds support solidly the request of Chile, that the AOAC 959.08 method is typified as Type I or III Method.

### References

- AOAC Official Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison Biological Method J. AOAC International 2005. 49.10.01.
- Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Method. Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins ([www.aesa.msc.es](http://www.aesa.msc.es)).
- Oshima, Y., 1995a. Post-Column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeph, G.M. Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.) IOC Manuals and Guides No. 33, UNESCO 1995
- The EFSA Journal (2009) 1019, 46-76. Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group1 Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2006-065E) Adopted on 25 March 2009
- Informe Evaluación de los Resultados de los Ensayos de Interlaboratorios de Análisis de Veneno Paralizante (VPM) en Mariscos organizados por el Instituto de Salud Pública de Chile; Ministerio de Salud, 2014.
- Informe Revisión del Desempeño del Método Oficial para Toxinas Marinas Paralizantes (AOAC 959.08) en laboratorios Chilenos de la Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria ,2014.
- Suárez-Isla, B., Guzmán, L. 1999. "Floraciones de Algas Nocivas". Serie "Orientaciones en Ciencias, Tecnología y Cultura", Editorial Universitaria, Santiago, Chile 98 pp.
- Suárez-Isla, B.; López, A.; Hernández, C.; Clément, A; Guzmán L. 2002. "Impacto económico de las floraciones de microalgas nocivas en Chile y datos recientes sobre la ocurrencia de Veneno Amnésico de los Mariscos". In: Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Eds.: Sar, E.A., M.E. Ferrario & B. Reguera. Monografías del Instituto Español de Oceanografía, Vigo (2002), pp. 259-268.

### (SPANISH)

Chile, Belice, Costa Rica, Cuba, Perú y Uruguay, agradecen a los miembros del Comité la oportunidad de presentar sus aportes y observaciones respecto al Proyecto de Criterios de Rendimiento para los Métodos de Referencia y Confirmación para Biotoxinas Marinas (Sección I.8.6 Determinación de biotoxinas) de la Norma para los Moluscos Bivalvos Vivos y los Moluscos Bivalvos Crudos.

Durante la 33ª sesión del CCFFP, se alcanzó el consenso en relación a los criterios para la determinación de biotoxinas y se acordó remitir el Anteproyecto al 37º período de Sesiones de la Comisión para su adopción en el Trámite 8 y al CCMAS para su ratificación (*endorsement*).

Dos semanas después, en la 35ª sesión del CCMAS, en el punto I-8.6.2 del Apéndice II, el método de bioensayo en ratón (AOAC 959.08) para la determinación de saxitoxinas o toxinas paralizantes fue tipificado como un método Tipo IV. No obstante, en diversos países del mundo, el bioensayo en ratón se emplea para fines de control, inspección y/o reglamentación o referencia desde hace más de 50 años.

Frente a esta situación, Chile, apoyado por un número de países, propuso en la 37ª sesión de la CAC, que el Anteproyecto de Norma generado en la 33ª sesión del CCFFP, no se aprobase en esa sesión de la Comisión, con la intención de que fuera devuelto a los Comités Técnicos correspondientes, para su discusión y recuperación del sentido de lo consensuado originalmente. Frente a esto, la Comisión decidió aprobar la Sección I-8.6.1 y devolver la Sección I-8.6.2 al CCMAS, pidiéndole que examinara la clasificación de los métodos de que se trataba, y alentó a los países miembros a presentar información con el fin de que el CCMAS tomara una decisión al respecto.

Producto de lo anterior, y en consecuencia con el Documento CX/MAS 15/36/2, enviado en diciembre de 2014 que hace referencia en su ítem A “Decisiones de la 37 sesión de la comisión con respecto a la labor del comité”, a “Normas y textos afines adoptados, y a los métodos para la determinación de biotoxinas marinas”, Chile evaluó la información disponible sobre el **Método Oficial AOAC 959.08**, para la revisión de su tipificación, según los antecedentes que se muestran a continuación.

## Introducción

Las biotoxinas marinas en mariscos son generadas por Floraciones Algales Nocivas (FAN) que son fenómenos dinámicos, caracterizados por cambios frecuentes en el área litoral afectada, en la distribución espacial, la estratificación, la concentración de microalgas e incluso la concentración celular de las toxinas presentes y su composición (Suárez- Isla y Guzmán, 1999).

Uno de los grupos de toxinas marinas que se han descrito con más frecuencia y/o que ejercen un mayor impacto en la salud pública y en las diversas áreas geográficas del planeta y, en especial, en el Cono Sur Americano, pertenecen al grupo del veneno paralizante de moluscos (VPM) o saxitoxinas (Lagos y cols. 2002, Guzmán y cols. 2002, Suárez-Isla y cols, 2002).

El VPM corresponde a un grupo de neurotoxinas hidrosolubles y altamente termoestables que afectan el sistema nervioso central y que causan parálisis muscular, lo que puede provocar la muerte al individuo. Como consecuencia de una intoxicación por estas biotoxinas marinas, el afectado tiene un alto riesgo de fallecer. Dado lo anterior, los programas de control y vigilancia deben contar con metodologías de análisis que logren satisfacer los objetivos propuestos para proteger la salud pública de las personas expuestas al riesgo de intoxicación por consumo de mariscos contaminados por toxinas marinas.

Para este fin, el Método Oficial AOAC 959.08 de Bioensayo en Ratón (MBA siglas en inglés) ha sido utilizado por más de 50 años por diversos países como método de referencia y para fines de control, inspección o reglamentación. El método posee la especificidad adecuada para determinar la toxicidad del grupo de las saxitoxinas, con un amplio margen de seguridad, permitiendo mantener políticas públicas efectivas. Cabe señalar, que este fue el método utilizado para el estudio de la respuesta entregada por el bioensayo en ratón que permitió establecer los Factores de Equivalencia Tóxica (TEFs siglas en inglés), para las biotoxinas análogas a la saxitoxina, y con base en esto la cuantificación de los congéneres de la saxitoxina determinados por los métodos cromatográficos desarrollados posteriormente, pudiendo ser expresados en unidades de saxitoxina equivalentes (STXeq).

De acuerdo a los criterios generales de selección de los métodos de análisis del Manual de Procedimientos del Codex, este método oficial fue aprobado por la Organización Internacional AOAC, y los antecedentes de su desempeño demuestran su exactitud y precisión, como también su practicabilidad, por lo que ha sido utilizado de manera habitual por diversos países para fines de control, fiscalización o como método de referencia.

Según levantamiento del CCLAC, entre los países que actualmente utilizan de manera habitual este método están Argentina, Brasil, Colombia, Costa Rica, Chile, Estados Unidos, Uruguay, México, Perú y El Salvador. República Dominicana, Trinidad y Tobago y Cuba, están evaluando la implementación de esta metodología para fines de control de las importaciones provenientes de países afectos a VPM, debido a su bajo costo.

#### Resultados de la evaluación

De acuerdo con la evaluación de la información sobre la aplicación del Método Oficial AOAC 959.08 en 11 laboratorios oficiales y autorizados en Chile desde el año 2000, se concluye que éste **posee los atributos necesarios para ser adecuado al fin previsto**, a saber, la determinación de la toxicidad de toxinas paralizantes en alimentos de origen marino (moluscos bivalvos, gasterópodos y tunicados). El Límite Máximo Permitido (LMP) es de 80 µg STXeq/100g (es decir, 800 µg STXeq/kg) de tejido de marisco.

En relación a los criterios de desempeño del método, se recabaron antecedentes respecto al Límite de cuantificación, veracidad y Precisión, que se detallan a continuación.

#### 4. Límite de cuantificación (LOQ)

De acuerdo con el Documento *Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins Biological Methods* del Laboratorio de Referencia de Biotoxinas Marinas de la UE. “el límite de detección es estudiado inoculando diluciones de estándar de baja concentración de toxinas y observando los síntomas”.

Como la medición indicada por el Método Oficial AOAC 959.08 requiere determinar el tiempo de muerte del animal de experimentación y no su sintomatología, determinar el Límite de Detección (LOD) no tiene practicabilidad para su fin.

En relación al LOQ, el Documento *Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Methods*, menciona que el límite **teórico** de cuantificación (LOQ) es de 16,92 µg STXeq/100g (169,2 µg STXeq/kg) señalando que este límite debe ser confirmado experimentalmente.

De acuerdo con el documento EFSA-Q-2006-065E *Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain*, para el método de MBA el límite de detección/cuantificación, se encuentra entre 280 y 402 µg STXeq/kg.

Para la determinación del LOQ, 4 laboratorios chilenos han establecido la Concentración Letal Mínima Cuantificable (CLMC) de manera experimental, considerando un tiempo de muerte equivalente al máximo provisto por la tabla de Sommer (60 minutos), el peso del ratón más pequeño que utiliza el método y el Factor de Conversión (CF) del laboratorio. El peso y tiempo de muerte se convierten a la unidad ratón corregida, para luego mediante la fórmula de toxicidad, obtener el resultado. Los resultados se expresan en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentración Letal Mínima Cuantificable (CLMC) por Laboratorio

Laboratorio	Año	CLMC (µg STXeq/100 g)
Laboratorio de Toxinas Marinas Sede Santiago, Universidad de Chile	2002	26,0
	2003	28,0
	2004	29,5
	2005	31,0
	2006	27,0
	2007	28,0
	2008	26,3

	2009	28,0
Laboratorio de Toxinas Marinas Sede Castro, Universidad de Chile	2006	28,3
	2007	27,4
	2008	29,1
	2009	25,4
	2010	25,4
	2011	25,4
	2012	28,3
	2013	25,7
	2014	25,7
	ISP- Laboratorio Nacional de Referencia Ministerio de Salud de Chile	2013
Laboratorio Secretaría Ministerial de Salud de Región de Magallanes y Antártica Chilena	2013	27,4

Fuente: Informe Revisión del Desempeño del Método oficial para toxinas Marinas Paralizantes (AOAC 959.08) en Laboratorios Chilenos- Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria.2014.

Se observa que experimentalmente el valor obtenido para el LOQ es mayor al teórico indicado por el *Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Methods*, y se encuentra en el rango de **25,4 a 32,0 µg STXeq/100 g**. Estos valores son significativamente inferiores al valor de LMP, otorgando un margen de seguridad adecuado desde el punto de vista de la protección a la salud de las personas.

## 5. Veracidad

Para la determinación de la veracidad se evaluaron los datos de recuperación recopilados desde el año 2008, los cuales se obtuvieron a través de las rondas de ensayos de aptitud interlaboratorio (PEEC) organizadas por el Instituto de Salud Pública de Chile, Laboratorio de Referencia del Ministerio de Salud e Instituto Metrológico. Los resultados de porcentajes de recuperación se presentan en la Tabla 2:

Tabla 2: Porcentajes de recuperación obtenidos en rondas de ensayo de aptitud interlaboratorios (PEEC)

Año	Nº de laboratorios	Valor asignado µg STXeq/100 g	% de Recuperación Mínimo	% de Recuperación Máximo
2008	13	81,9	100	120
2009	14	81,9	80	111
2010	11	126,6	77	115
2011	9	256,6	83	114



<b>2012</b>	15	553,0	71	107
<b>2013</b>	12	519,6	79	118

Fuente: Informe Evaluación de los Resultados de los Ensayos de Interlaboratorios de Análisis de Veneno Paralizante de Mariscos (VPM) organizados por el Instituto de Salud Pública de Chile; Ministerio de Salud.

Si bien las directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios establecidos por el CCMAS están enfocadas a métodos químicos instrumentales según lo establecido por el Manual de Procedimientos del Codex Alimentarius, en este caso este método biológico en particular presenta un porcentaje de recuperación de un 71 % a 120 % (Tabla 2), que se compara favorablemente con las directrices establecidas por el CCMAS en la cual para la concentración de interés evaluada de 100 µg/kg, el rango del porcentaje de recuperación admisible es de 80 % a 110 %, para analitos individuales.

Como comparación, los “Criterios de rendimiento para los métodos de determinación de biotoxinas marinas”, establecidos en el punto I-8.6.1 de la Norma para los Moluscos Bivalvos Vivos y los Moluscos Bivalvos Crudos, señala rangos de aceptabilidad del 50 % - 130 % de Recuperación para los métodos cromatográficos AOAC 2005.06, NMKL 182:2005, EN 14526:2004, AOAC 2011.02 y NMKL 197:2013 oficializados por el Codex para VPM el año 2014.

## 6. Precisión

El documento *Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Methods*, señala que la repetibilidad en este método biológico no puede ser estimada debido a que el instrumento de medición es un ratón, el cual, puede ser utilizado sólo una vez. Sin embargo, Chile ha estimado necesario determinar la Reproducibilidad Interlaboratorio, con base en las rondas de ensayos de aptitud.

Tabla 3: Estadísticos de resumen de los resultados de los participantes respecto al valor asignado.

Año	Valor asignado de Ítem de ensayo	Resultados obtenidos			Unidades
		Mediana	Promedio Robusto	MAD (Desviación absoluta promedio)	
2008	81,9	91	91,9	4,5	µg STX eq/100g
2009	81,7	85,5	82,9	4,7	µg STX eq/100g
2010	126,6	127	125,2	11,74	µg STX eq/100g
2011	256,6	228	247,9	15	µg STX eq/100g
2012	553,0	506,5	507,9	43,5	µg STX eq/100g
2013	519,6	519,2	517,3	27,0	µg STX eq/100g

Fuente: Informe de Evaluación de los Resultados de los Ensayos de Interlaboratorios de Análisis de Veneno Paralizante de Mariscos (VPM) organizados por el Instituto de Salud Pública de Chile; Ministerio de Salud. El número de participantes corresponde al mismo citado en la Tabla N°2.

Tabla 4: Desviaciones estándares relativas en rondas interlaboratorios de Veneno Paralizante de moluscos (VPM ) PEEC-SP6 por año, periodo 2008 a 2013.

Año	Valor asignado de Ítem de ensayo $\mu\text{g STXe}/100\text{g}$	$RSD_R\%$	Horwitz $RSD_{Rh}\%$
2008	81,9	4,8 %	16,5 %
2009	81,7	5,7 %	16,5 %
2010	126,6	9,4 %	15,4 %
2011	256,6	6,1 %	13,9 %
2012	553,0	8,6 %	12,4 %
2013	519,6	5,2 %	12,5 %

Fuente: Informe de Evaluación de los Resultados de los Ensayos de Interlaboratorios de Análisis de Veneno Paralizante de Mariscos (VPM) organizados por el Instituto de Salud Pública de Chile; Ministerio de Salud.

Se observa que las desviaciones estándares relativas porcentuales de los interlaboratorios ( $RSD_R\%$ ) son inferiores al valor de Horwitz para el nivel estudiado, lo que demuestra que el método es preciso a los niveles estudiados.

Cabe destacar que la reproducibilidad obtenida supera en al menos la mitad de la reportada o pronosticada por AOAC para este método. Respecto de los métodos cromatográficos AOAC 2005.06, NMKL 182:2005, EN 14526:2004, AOAC 2011.02 y NMKL 197:2013 el criterio para este parámetro oficializado por el Codex fue de < 44 %.

Cabe destacar que durante 20 años de control oficial de los productos de exportación afectables por toxinas paralizantes no se ha informado de alertas en el extranjero para este grupo de toxinas.

## Conclusiones

De acuerdo con los antecedentes evaluados, es posible concluir lo siguiente:

- g. Los valores de LOQ obtenidos otorgan un margen de seguridad adecuado.
- h. Respecto de la evaluación de veracidad, los valores de recuperación obtenidos en la investigación oscilan entre 71 % y 120 %, lo que se considera aceptable de acuerdo a los rangos establecidos por el Codex para los métodos cromatográficos AOAC 2005.06, NMKL 182:2005, EN 14526:2004, AOAC 2011.02 y NMKL 197:2013, tal como se indica en el punto I-8.6.1 de la Norma para los Moluscos Bivalvos Vivos y los Moluscos Bivalvos Crudos.
- i. La precisión interlaboratorios queda demostrada dado que se cumple que las desviaciones estándares relativas son inferiores al valor de Horwitz recomendado para los niveles de concentración estudiados.
- j. La practicabilidad y aplicabilidad de este método han permitido su implementación en diversos países como método de referencia, así como también para fines de control y fiscalización.

La evidencia obtenida indica que el método oficial AOAC 959.08 **posee los atributos necesarios para ser adecuado al fin previsto**, a saber, la determinación de la toxicidad de toxinas paralizantes en alimentos de origen marino de acuerdo al límite máximo permitido a nivel mundial de 80 µg STXeq/100g de molusco, y por tanto su uso para fines de control, inspección o reglamentación es válido.

Los criterios del método en base a la información evaluada se encuentran en los siguientes valores:

Intervalo mínimo aplicable (µg STXeq/100 g)	LOQ (µg STXeq/100 g)	Precisión expresada como % RSD <sub>R</sub>	Veracidad expresada como Porcentaje de Recuperación (% R)
50 -150	30	< 44	70 a 120

Por los antecedentes presentados Chile considera que el desempeño analítico del método AOAC 959.08 es satisfactorio en términos de Exactitud (veracidad y precisión), rango de aplicabilidad, practicabilidad e historial de protección de la salud humana. Estos antecedentes fundamentan sólidamente la solicitud de Chile de que el método AOAC 959.08 sea tipificado como Método Tipo I ó III.

#### Referencias

- AOAC Official Method 959.08 Paralytic Shellfish Poison Biological Method J. AOAC International 2005. 49.10.01.
- Validation Protocol for PSP and Lipophilic Toxins biological Method. Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins ([www.aesa.msc.es](http://www.aesa.msc.es)).
- Oshima, Y., 1995a. Post-Column derivatization HPLC methods for Paralytic Shellfish Poisons. Manual on Harmful Marine Microalgae. Hallegraeph, G.M. Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.) IOC Manuals and Guides No. 33, UNESCO 1995
- The EFSA Journal (2009) 1019, 46-76. Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group1 Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2006-065E) Adopted on 25 March 2009
- Informe Evaluación de los Resultados de los Ensayos de Interlaboratorios de Análisis de Veneno Paralizante (VPM) en Mariscos organizados por el Instituto de Salud Pública de Chile; Ministerio de Salud, 2014.
- Informe Revisión del Desempeño del Método Oficial para Toxinas Marinas Paralizantes (AOAC 959.08) en laboratorios Chilenos de la Agencia Chilena para la Calidad e Inocuidad Alimentaria ,2014.
- Suárez-Isla, B., Guzmán, L. 1999. "Floraciones de Algas Nocivas". Serie "Orientaciones en Ciencias, Tecnología y Cultura", Editorial Universitaria, Santiago, Chile 98 pp.
- Suárez-Isla, B.; López, A.; Hernández, C.; Clément, A; Guzmán L. 2002. "Impacto económico de las floraciones de microalgas nocivas en Chile y datos recientes sobre la ocurrencia de Veneno Amnésico de los Mariscos". In: Floraciones Algales Nocivas en el Cono Sur Americano. Eds.: Sar, E.A., M.E. Ferrario & B. Reguera. Monografías del Instituto Español de Oceanografía, Vigo (2002), pp. 259-268.

#### **KENYA**

Kenya proposes that it is necessary to come up with criteria for biological method with a view to placing it in the right class for example for dispute solution. Toxicity can only be tested using biological method and this biological method should be clearly classified.