



Tema 7 del programa

CX/FFP 12/32/7

PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS COMITÉ DEL CODEX SOBRE PESCADO Y PRODUCTOS PESQUEROS

32.^a reunión

Bali, Indonesia

1 - 5 de octubre de 2012

Anteproyecto de Criterios de Rendimiento para los Métodos de Referencia y Confirmación para Biotoxinas Marinas en la Norma para los Moluscos Bivalvos Vivos y Crudos

OBSERVACIONES EN EL TRÁMITE 3

(Kenia, Estados Unidos de América)

KENIA

Respal damos la inclusión de este documento en la Sección I-8.6. El documento es una buena guía e incorpora límites establecidos. Servirá de orientación a los elaboradores y a las autoridades reguladoras acerca de las sustancias que se habrán de analizar y facilitará la interpretación de los resultados.

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Observación general:

Los Estados Unidos de América desean agradecer a los miembros del Comité la oportunidad de formular observaciones a este documento y la labor del grupo de trabajo electrónico en la preparación del mismo para su consideración por parte del Comité. Aunque coincidimos con la idea general de que es preferible incluir en la Norma criterios sobre métodos de referencia en lugar de métodos de referencia específicos, nos sigue preocupando que los criterios propuestos no garanticen que los métodos de referencia se ajustan a criterios uniformes. Además, los criterios propuestos parecen excluir métodos de carácter biológico como el bioensayo en ratón, reconocido mundialmente como el método de referencia oficial para la saxitoxina.

Para proteger la salud pública, la medida pertinente es la toxicidad total en los bivalvos, no la composición de toxinas. El método de referencia ideal debería medir la toxicidad total directamente en base a funciones biológicas. Los métodos de análisis para múltiples análogos no garantizan la detección de todas las toxinas que contribuyen a la toxicidad y requieren además que se realice un bioensayo para convertir los niveles de toxinas a valores de toxicidad. En lo que respecta al grupo de las saxitoxinas, el bioensayo en ratón y el ensayo de unión a receptores tienen las características requeridas por un método de referencia de aplicación mundial.

Estados Unidos utiliza con fines normativos internos tanto las pruebas HPLC para el análisis de múltiples análogos como el bioensayo en ratón, y no desea que se excluyan los métodos de análisis para múltiples análogos. De hecho, los cambios que sugerimos en los criterios facilitarán la utilización de métodos HPLC para el análisis de múltiples análogos que de otro modo podrían quedar excluidos de los actuales criterios propuestos. Los métodos de referencia para el análisis de múltiples análogos arrojan resultados precisos sobre la composición de toxinas cuando se miden todas las toxinas que pueden estar presentes en la muestra y siempre que el laboratorio cuente con el presupuesto y la pericia necesarios. Sugerimos que se modifiquen los criterios propuestos para dar cuenta de la variabilidad de los resultados de los métodos para múltiples análogos asociada al perfil de la toxina, así como de la escasa disponibilidad de patrones de referencia certificados para algunas toxinas que pueden contribuir a la toxicidad total. Asimismo, recomendamos que se

incluyan factores de conversión uniformes para la toxicidad de los análogos de manera que se puedan emplear los métodos de análisis para múltiples análogos como métodos de referencia. Aunque Estados Unidos apoya el correspondiente uso de métodos de análisis para múltiples análogos, seguimos considerando que, en la actualidad, el bioensayo en ratón es el mejor método de referencia del Codex para la saxitoxina porque: mide la toxicidad total directamente, proporciona una protección fiable en condiciones variables y es un método práctico para todos los países.

Sugerimos que se modifiquen los criterios propuestos para garantizar que los métodos satisfacen criterios cuantitativos uniformes y para contar con mayor flexibilidad a la hora de elegir el método. Los cambios propuestos se ajustan a las directrices del *Manual de Procedimiento del Codex* e incluyen el uso del bioensayo en ratón para el grupo de las saxitoxinas. En el Apéndice I se establecen criterios de rendimiento revisados que incorporan las recomendaciones formuladas en las observaciones que siguen.

Observaciones específicas:

Propuesta de título del Anteproyecto. Modificar como sigue:

“Anteproyecto de Criterios de Rendimiento para los Métodos de Referencia y ~~Confirmación~~ para Biotoxinas Marinas (para su inclusión en la Sección I-8.6 de la Norma para los Moluscos Bivalvos Vivos y Crudos)”

Fundamento: los métodos que cumplen los criterios son métodos de referencia y no necesariamente de confirmación (p. ej.: métodos HPLC para el análisis de múltiples análogos). Además, los métodos de confirmación no tienen por qué ser de referencia (p. ej.: las pruebas para analizar propiedades físicas/químicas).

Añadir la siguiente modificación al título actual de la sección correspondiente de la Norma para los bivalvos:

“I-8.6 Determinación de biotoxinas: **criterios de rendimiento para la selección de métodos**”

Fundamento: ser coherentes con el título actual de la sección de la Norma para los bivalvos y su sistema de numeración e informar de que se usan criterios de rendimiento en la selección de métodos.

Antecedentes. Suprimir la información sobre los antecedentes de la Norma para los Bivalvos.

Fundamento: los antecedentes sobre criterios de métodos se encuentran en el *Manual de Procedimiento del Codex*, en los informes de los períodos de sesiones y en los informes de los grupos de trabajo; resulta innecesario incluirlos en la Norma para los bivalvos.

Antecedentes, 1^{er} párrafo. Eliminar.

La finalidad de los criterios para los métodos está claramente expuesta en el Manual de Procedimiento del Codex y, máxime contando con una lista de métodos de referencia, no se requieren explicaciones adicionales.

La afirmación de que estos son métodos “que las autoridades competentes pueden utilizar con fines normativos para seleccionar métodos adecuados de control de biotoxinas” se aleja del propósito principal de los métodos de referencia enunciado en las normas (para casos de controversia), y puede inducir a confusión, ya que cualquier método, incluidos los métodos de detección, aprobado por una autoridad competente podría usarse con fines normativos.

Antecedentes, 1^{er} párrafo, 4^a línea, nota al pie de página #1 referente a la definición del método de referencia. Eliminar la nota al pie de página.

Fundamento: los métodos de referencia se definen adecuadamente en los “Principios para el establecimiento de métodos de análisis del Codex” (Manual de Procedimiento del Codex); a saber:

“Métodos de referencia (Tipo II). Definición: los métodos del Tipo II son los denominados métodos de referencia, que se utilizan cuando no se aplican los métodos del Tipo I. Se seleccionan de entre los métodos del Tipo III (según se definen más adelante). Se recomendará su uso en casos de controversia y para fines de verificación”.

El texto de la nota al pie propuesta se ha extraído de las “Directrices sobre Buenas Prácticas de Laboratorio en el Análisis de Residuos de Plaguicidas” (CAC/GL 40-1993) y reza: “Por lo general estos métodos han sido objeto de estudios en colaboración, y suelen basarse en la espectrometría molecular”. La nota al pie propuesta presenta la siguiente modificación: “Por lo general estos métodos no han sido objeto de estudios en colaboración, y suelen basarse en la espectrometría molecular”.

Estimamos que, en general, los métodos de referencia para las biotoxinas deberían ser objeto de estudios en colaboración y que la definición referente a los plaguicidas no es de aplicación a las biotoxinas de algas, para las que suelen usarse bioensayos como métodos de referencia.

Antecedentes, 2º párrafo. Eliminar.

Fundamento: en los métodos de carácter biológico, como el bioensayo en ratón y el ensayo de unión a receptores, no se necesitan datos sobre el perfil de la toxina presente. Sin embargo, en los métodos de análisis para múltiples análogos, dicha información es esencial; debería tratarse junto a los criterios definitivos y no en la sección de antecedentes.

Antecedentes, 3º párrafo. Eliminar.

Fundamento: las directrices sobre utilización de métodos de detección y evaluación de estrategias normativas tienen mejor acomodo en la Sección 7.2.2.3 “Control de biotoxinas marinas” del Código de Prácticas para el Pescado y los Productos Pesqueros.

Criterios de rendimiento/principios generales propuestos. Suprimir esta sección, incluidas las disposiciones (a) - (g), y sustituirla por el texto que sigue:

“I-8.6.1 Criterios Generales

(i) Los métodos de referencia se elegirán con arreglo a lo establecido en la Sección I-8.6.2 (Criterios numéricos para la selección de métodos) y en la Sección I-8.6.3 (Aplicación de criterios numéricos para la selección de métodos) y de conformidad con los “Criterios generales para la selección de métodos de análisis” y con los “Criterios generales para seleccionar métodos de análisis validados por un solo laboratorio”, ambos contenidos en el *Manual de Procedimiento del Codex*.

(ii) El método seleccionado debería elegirse en base a su practicabilidad y se debería dar preferencia a los métodos cuya aplicabilidad favoreciera la ejecución sistemática del método.

Fundamento: No es necesario incluir en la Norma de los bivalvos principios cualitativos generales que además pueden dar lugar a una aplicación errónea de los criterios. La selección de métodos ajustada a criterios es sistemática; prácticamente todos los métodos validados que satisfacen los criterios numéricos son aceptables.

En el Manual de Procedimiento del Codex ya se establecen criterios generales adecuados, que se citan en el apartado I-8.6.1(i) más arriba. La mayor parte de los criterios propuestos no se aplica exclusivamente a los métodos de determinación de biotoxinas de algas y es innecesario repetirlos en la Norma. Sin embargo, de acuerdo con el Manual de Procedimiento, el criterio general mencionado en el apartado I-8.6.1(ii) debe tenerse en cuenta cuando se adopte un enfoque por criterios.

Muchos de los criterios generales propuestos que usan la expresión “se dará preferencia a” abarcan los mismos parámetros que los criterios numéricos propuestos. Dichos criterios “preferentes” pueden conducir a un incumplimiento de los criterios numéricos o a argumentos subjetivos contrarios al uso de métodos que satisfagan los criterios numéricos.

Algunos de los criterios generales propuestos se refieren a características propias de los métodos de análisis para múltiples análogos y parecen excluir los métodos que miden la toxicidad total directamente. Los criterios que sean privativos de los métodos de análisis para múltiples análogos deberían quedar fuera de las disposiciones generales.

Proponemos añadir una nueva sección tras el cuadro de criterios numéricos, al objeto de estipular cómo aplicar los criterios numéricos para la toxicidad total a los métodos de análisis para múltiples análogos (véanse las observaciones relativas a la nueva Sección I-8.6.3 “Aplicación de criterios numéricos para la selección de métodos”).

Cuadro

Título del cuadro: “Parámetros de rendimiento para los métodos de determinación de biotoxinas marinas”. Modificar como sigue:

“I-8.6.2 Criterios numéricos para la selección de métodos”

Fundamento: ser coherentes con la terminología relativa a los criterios numéricos utilizada en el Manual de Procedimiento del Codex y seguir el sistema de numeración utilizado en la Norma para los bivalvos (véase

la observación anterior referente al nuevo título de sección I-8.6 “Determinación de biotoxinas: criterios de rendimiento para la selección de métodos”).

Abreviaturas de toxinas. Trasladar las abreviaturas a la columna de denominación de las toxinas y colocarlas entre paréntesis junto a los nombres correspondientes.

Fundamento: destinar la columna que queda vacía a los factores de equivalencia tóxica (véase la siguiente observación).

Añadir “Factores de equivalencia tóxica (FET)”. Ejemplo:

Toxina	Factor de equivalencia tóxica

Fundamento: los factores de equivalencia tóxica deberían consignarse en el cuadro relativo a los criterios a fin de que los métodos de análisis para múltiples análogos puedan usarse como métodos de referencia del Codex. Si los países utilizan un FET diferente los resultados de los análisis no serán comparables (para los valores recomendados de FET, véanse las observaciones específicas para cada grupo de toxina).

Columnas “Unidades” y “Nivel máximo”. Unir las dos columnas y modificar el título como sigue:

		<u>Nivel máximo /kg en la carne de molusco</u>
Grupo de las saxitoxinas	Toxicidad total	≤ 0,8 miligramos (2HCL) de equivalente de saxitoxina
Grupo del ácido okadaico	Toxicidad total	≤ 0,16 miligramos de equivalente de ácido okadaico
Grupo del ácido domoico	Ácido domoico	≤ 20 miligramos de ácido domoico
Grupo de la brevetoxina	Toxicidad total	≤ 200 unidades ratón o 0,8 miligramos de equivalente de BTX2
Grupo de los azaspirácidos	Toxicidad total	≤ 0,16 miligramos de equivalente de AZA1

Fundamento: ser coherentes con las unidades y la terminología empleadas en la Sección I-5.2 de la Norma para los bivalvos (disposiciones relativas a las biotoxinas).

Límite de detección/Límite de cuantificación: suprimir las columnas “Límite de detección” y “Límite de cuantificación”, así como los criterios asociados a las mismas.

Fundamento: en la Sección 1.2 de las “Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios de método y/o evaluar los métodos para el cumplimiento de los mismos” del Manual de Procedimiento del Codex (20ª edición, pág. 75) se explica claramente que los criterios sobre límites de detección (LD)/límites de cuantificación (LC) se usan solo como alternativa a los criterios sobre intervalo mínimo aplicable. La oración reza: “Como alternativa al establecimiento de un rango mínimo aplicable, podrían establecerse como criterios los valores numéricos del LD y el LC”.

En los criterios propuestos se establece un planteamiento acorde con el intervalo mínimo aplicable. Los criterios no deberían incluir disposiciones contradictorias para la aplicabilidad del método.

Se aboga por criterios sobre intervalo mínimo aplicable porque los criterios LD/LC, calculados de conformidad con el Manual de Procedimiento del Codex, limitarían injustificablemente el uso de métodos de referencia biológicos e instrumentales de uso ampliamente extendido.

Precisión en LM. Modificar el título de la columna como sigue:

“Precisión en LM (RSD_R)”

Fundamento: reflejar que la medida de precisión es la desviación típica relativa (RSD_R) interlaboratorios como reza en el Manual de Procedimiento del Codex. (Se deberían eliminar las comas de decimales que preceden a los valores en la columna).

Recuperación. Modificar el título de la columna como sigue:

“Porcentaje de recuperación”

Fundamento: señalar que los valores se expresan en porcentajes.

Conformidad. Suprimir la columna.

Fundamento: el acrónimo “MRC” se repite a lo largo de toda la columna en la fila de cada toxina. Facilitaría la comprensión dar cuenta de esta información en una sola frase (véase la observación correspondiente al apartado “Todos los métodos (ii)” de la nueva sección propuesta “I-8.6.3 Aplicación de criterios numéricos para la selección de métodos”).

Intervalo mínimo, límite de detección, límite de cuantificación (criterios específicos para análogos). Suprimir todos los criterios numéricos asociados a los análogos individuales de toxinas.

Fundamento: los criterios específicos para análogos no garantizan que los métodos cumplan los criterios establecidos de toxicidad total. Los criterios específicos para análogos son innecesarios, irrealistas y demasiado restrictivos.

En las “Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios de método y/o evaluar los métodos para el cumplimiento de los mismos” recogidas en el Manual de Procedimiento del Codex se afirma que “Sólo es necesario conocer la disposición del producto y su nivel máximo al establecer valores numéricos relativos a los criterios de método”. No existen disposiciones sobre niveles máximos para los análogos individuales de toxinas; por consiguiente, no se les puede asignar criterios individuales efectivos. Todos los criterios deben estar en consonancia con las disposiciones sobre niveles máximos de toxicidad total contenidas en la Norma para los bivalvos.

Los criterios específicos propuestos para análogos no garantizan que los métodos se ajusten a los criterios esenciales de toxicidad total. Por ejemplo, se permite que la suma de los intervalos mínimos propuestos específicos para análogos supere el intervalo mínimo de toxicidad total.

Los criterios sobre métodos de análisis para múltiples análogos deberían permitir cierto grado de variabilidad realista en el rendimiento de los métodos para análogos individuales de toxinas, siempre que se satisfagan los criterios generales de toxicidad total. Recomendamos que se apliquen “criterios relacionales” flexibles a fin de garantizar que los métodos de análisis para múltiples análogos cumplen los criterios de toxicidad total (véase la nueva sección propuesta “I-8.6.3 Aplicación de criterios numéricos para la selección de métodos”).

Añadir una nueva sección; a saber:

“I-8.6.3 Aplicación de criterios numéricos para la selección de métodos”

Fundamento: proporcionar orientación para determinar que el método cumple los criterios numéricos de toxicidad total. Aportar criterios relacionales que garanticen que los métodos de análisis para múltiples análogos satisfacen los criterios de intervalo mínimo aplicable, precisión y recuperación correspondientes a la toxicidad total, al tiempo que se permite cierta flexibilidad en el rendimiento de los métodos para análogos individuales.

Nueva Sección I-8.6.3. Añadir los siguientes criterios bajo “Todos los métodos”.

“Todos los métodos

- i. Todos los métodos deben cumplir los criterios relativos a la toxicidad total.**

Fundamento: aclara que los métodos biológicos e instrumentales para el análisis de análogos múltiples deben satisfacer los criterios relativos a niveles máximos de toxicidad total recogidos en la Norma para los bivalvos.

- ii. La evaluación de la conformidad se realizará empleando materiales de referencia certificados”.**

Fundamento: información suprimida del cuadro. No es necesario repetir “MRC” para cada análogo de toxina incluido en el cuadro.

Nueva Sección I-8.6.3. Añadir los siguientes criterios bajo el epígrafe “Métodos de análisis para múltiples análogos”.

“Métodos de análisis para múltiples análogos”

- i. **Se deben validar todos los métodos para todos los análogos de toxinas que potencialmente puedan contribuir a la toxicidad total de la muestra y se deben utilizar para detectar dichos análogos.**

Fundamento: garantizar que el método es aplicable a todos los análogos que se pudieran encontrar. Permite añadir o excluir análogos, según convenga.

- ii. **Al aplicar el método se deben usar materiales de referencia certificados para cada analito.**

Fundamento: garantizar la precisión en la identificación y la cuantificación del analito.

- iii. **Para calcular la toxicidad total se deben usar los factores de equivalencia tóxica (FET) descritos en la Sección I-8.6.2. Para las toxinas que no dispongan de FET, se utilizarán FET reconocidos internacionalmente.**

Fundamento: se requieren FET uniformes para usar como métodos de referencia los métodos de análisis para múltiples análogos.

- iv. **Determinar que los métodos cumplen los criterios de “intervalo mínimo aplicable de toxicidad total”: la suma de los límites de cuantificación validados (expresados en equivalentes tóxicos) para cada análogo de toxina que pueda contribuir a la toxicidad total de la muestra no debe superar el límite inferior del de intervalo mínimo aplicable de toxicidad total.**

Fundamento: determinar que los métodos de detección de múltiples análogos cumplen los criterios de intervalo mínimo aplicable de toxicidad total. Con esta disposición se permite variar los límites de cuantificación para cada análogo, pero se evita el empleo de un método cuando los múltiples análogos de toxinas se encuentren por debajo del límite de cuantificación y la toxicidad total pueda superar al límite inferior del intervalo mínimo aplicable.

- v. **Determinar que los métodos se ajustan a los criterios de “precisión de la toxicidad total”: la precisión de la toxicidad total (RSD_R), para una muestra con nivel máximo se calcula aplicando los datos de validación de la RSD_R de los análogos individuales a las concentraciones encontradas en la muestra.**

Ejemplo (se asume que las varianzas de los análogos son independientes):

$RSD_{R \text{ toxicidad total}} \text{ estimada} = sd\{a.+b.+c...\}/\text{equivalentes totales en mg/kg} \times 100$

$$sd\{a.+b.+c.+...\} = \sqrt{sd\{a\}^2 + sd\{b\}^2 + sd\{c\}^2 + \dots}$$

$sd\{a\}$ = desviación típica interlaboratorios para la toxina {a} (calculada tras la conversión a equivalentes tóxicos) con respecto a la concentración registrada en la muestra.

Nota: la $sd\{a\}$ se puede estimar aplicando la $RSD_{R\{a\}}$ de validación a la concentración más próxima del analito. Por ejemplo: $sd\{a\} = RSD_{R\{a\}} \times \text{equivalentes en mg}\{a\}/\text{kg} \div 100$

Fundamento: determinar que los métodos de detección de múltiples análogos cumplen los criterios de precisión de la toxicidad total. Los valores de precisión varían en función del análogo y de la concentración de cada toxina; por tanto, la precisión de la toxicidad total debería estimarse para los perfiles de toxina objeto de medición.

- vi. **Determinar que los métodos cumplen los criterios de “recuperación de la toxicidad total”: la recuperación de la toxicidad total es un promedio ponderado de los valores de recuperación correspondientes a los análogos individuales en la matriz de la muestra, ponderado por las cifras de equivalencia tóxica de la muestra”.**

Fundamento: determinar que los métodos de detección de múltiples análogos cumplen los criterios sobre recuperación de la toxicidad total. Los valores de recuperación varían para cada análogo de toxina; por tanto, la recuperación de la toxicidad total debería estimarse para los perfiles de toxina objeto de medición.

Grupo de las saxitoxinas

Observación general:

En línea con la Consulta de Expertos especial FAO/IOC/OMS sobre biotoxinas en los moluscos bivalvos (2004), Estados Unidos considera que el bioensayo en ratón es el mejor método de referencia tipo II para la detección del grupo de las saxitoxinas y coincide en que persisten notables limitaciones al uso de métodos

HPLC en el análisis de análogos múltiples. En el informe de la Consulta de Expertos se considera que el límite inferior de utilidad para el bioensayo en ratón (0,4 mg de equivalente de STX/kg) es adecuado y se afirma que el bioensayo en ratón es de uso extendido y ha protegido la salud pública con éxito durante 60 años.

El bioensayo en ratón es el modelo de referencia formal con el que se comparan todos los demás métodos. El bioensayo en ratón se utilizó en estudios epidemiológicos para establecer el límite máximo de inocuidad de 400 unidades ratón por 100 gramos de carne. Para garantizar la seguridad pública, los resultados obtenidos con otros métodos deben correlacionarse estrechamente con los del bioensayo en ratón. El nivel máximo establecido en la Norma para los bivalvos (0,8 mg de equivalente de STX/kg) es una estimación del límite en unidades ratón, que se obtiene mediante inoculación a los ratones de determinadas cantidades de saxitoxina purificada. El bioensayo en ratón también se emplea para determinar la toxicidad relativa de los análogos de saxitoxina al objeto de que los métodos HPLC se puedan utilizar en análisis de múltiples análogos con fines normativos. El bioensayo en ratón es un “Método de definición” (tipo I del Codex), y se puede afirmar que, con arreglo al procedimiento del Codex, es el método de referencia requerido.

Los métodos HPLC para análisis de múltiples análogos no son métodos de confirmación, razón por la que con frecuencia se usa el bioensayo en ratón para confirmar los resultados de toxicidad total obtenidos a partir de HPLC y la espectrometría de masas para confirmar los compuestos específicos detectados.

El rendimiento de los métodos HPLC para la detección de saxitoxina depende del perfil de toxina objeto de análisis. Los parámetros de rendimiento varían en función del análogo; además, los errores intrínsecos de la medición de cada análogo se acumulan al calcular la toxicidad total. En caso de que las bajas concentraciones de numerosos análogos contribuyeran a que la toxicidad total fuera elevada, debería cuestionarse la capacidad de la HPLC para satisfacer los criterios de rendimiento.

Para algunos análogos de toxinas que habitualmente contribuyen a la toxicidad del marisco no se cuenta con métodos de análisis para múltiples análogos validados ni con patrones de referencia certificados. La Unión Europea manifestó al GTE que el cálculo de la toxicidad total realizado con un método HPLC a partir de muestras de Portugal y España arrojó resultados inferiores en un 50% a los obtenidos con bioensayo en ratón. La diferencia estribó en que el método HPLC no detectó la presencia de la GTX6 (B2). No existen patrones de referencia certificados para la C3 y la C4, que puedan contribuir de forma apreciable a la toxicidad total del molusco, especialmente en el hemisferio sur.

Los países en desarrollo tendrán dificultades para gestionar el funcionamiento de los laboratorios encargados de realizar pruebas HPLC para múltiples análogos. El mantenimiento del equipo y la preparación de muestras son laboriosos y caros. Se debería contar con expertos sumamente cualificados y con equipo de espectrometría de masas. Cuando las muestras se envían a laboratorios especializados desde zonas de recolección lejanas, se demora la obtención de los resultados. Si se intentan aplicar métodos HPLC con recursos limitados puede que se realicen menos análisis, se aumente el tiempo de espera para obtener los resultados, los resultados sea menos fiables y el riesgo para las personas sea mayor. Numerosos países han expresado al GTE, y en reuniones plenarias, su preocupación respecto a la impracticabilidad de los métodos HPLC y a la necesidad de utilizar el bioensayo en ratón. La imposibilidad de usar el bioensayo en ratón como método de referencia puede suponer una barrera comercial indirecta para estos países.

Estados Unidos apoya el uso de métodos instrumentales cuando sea posible, pero se opone a la inclusión de criterios que excluyan la utilización del bioensayo en ratón y no tengan en cuenta las limitaciones de los métodos HPLC para análisis de múltiples análogos.

Lista de toxinas. Añadir las siguientes toxinas y la nota que las acompaña:

N-sulfocarbamoil-goniautoxina-1 (C3)	
N-sulfocarbamoil-goniautoxina-4 (C4)	
Hidroxibenzoatos (GC1-6)	Es necesario determinar la contribución de los hidroxibenzoatos a la toxicidad total en bivalvos.

Fundamento: se debería establecer un listado de todos los análogos que puedan contribuir a la toxicidad total. No se debería obviar los análogos para los que no existan métodos validados y/o patrones de

referencia certificados. No es necesario cuantificar un análogo que no pueda contribuir a la toxicidad total (véase la observación acerca de la sección propuesta I-8.6.3 (i)).

Se sabe que la C3 y la C4 contribuyen de forma apreciable a la toxicidad de los bivalvos en el hemisferio sur y, en menor medida, en el Pacífico nororiental. Los hidroxibenzoatos de carácter lipofílico son un componente principal de las algas y es necesario determinar el papel que desempeñan en la toxicidad de las especies de bivalvos.

Lista de toxinas. Añadir la siguiente nota:

“Cuando estas toxinas estén presentes y contribuyan a la toxicidad total, los métodos de análisis para múltiples análogos deben cuantificar estos analitos directamente o, en caso de que no se disponga de patrones para las toxinas N-sulfocarbamoil, la cuantificación se realizará de forma indirecta mediante hidrólisis”.

Fundamento: se explica la utilidad de la lista. Se admite el uso de la hidrólisis para determinar la presencia de toxinas N-sulfocarbamoil cuando no se disponga de material de referencia certificado.

Añadir los siguientes factores de equivalencia tóxica:

Toxina	Factores de equivalencia tóxica
Saxitoxina (STX)	1,000
Neosaxitoxina (NEO)	0,924
Decarbamoil-saxitoxina (dcSTX)	0,513
Decarbamoil-neosaxitoxina (dcNEO)	
Goniautoxina-1 (GTX1)	0,994
Goniautoxina-2 (GTX2)	0,359
Goniautoxina-3 (GTX3)	0,638
Goniautoxina-4 (GTX4)	0,726
Goniautoxina-5 (B1)	0,064
Goniautoxina-6 (B2)	
Decarbamoil-goniautoxina-2 (dcGTX2)	0,154
Decarbamoil-goniautoxina-3 (dcGTX3)	0,377
N-sulfocarbamoil-goniautoxina-1 (C3)	0,013
N-sulfocarbamoil-goniautoxina-2 (C1)	0,006
N-sulfocarbamoil-goniautoxina-3 (C2)	0,096
N-sulfocarbamoil-goniautoxina-4 (C4)	0,058
Hidroxibenzoatos (GC1-6)	

Fundamento: es necesario incluir los FET (véase la observación anterior). Estados Unidos recomienda utilizar los FET publicados por Oshima (1995), reconocidos a escala internacional. Aún no se han establecido FET a partir de administración oral; sin embargo, los FET de Oshima obtenidos a partir de la administración intraperitoneal en ratones llevan 15 años protegiendo con éxito la salud pública.

Toxicidad total, Intervalo mínimo:

Cambiar el intervalo de “0,26 - 1,34” a “**0,40 - 1,20**”.

Fundamento: corregir los valores del intervalo mínimo aplicable de conformidad con la Sección 1.1 de las “Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios de método y/o evaluar los métodos para el cumplimiento de los mismos” contenidas en el *Manual de Procedimiento del Codex*. La razón de concentración adecuada para calcular el intervalo mínimo aplicable es 10^{-6} (0,000.001), y no 10^{-7} (0,000.000.1), ya que este valor es más próximo a la razón de concentración del analito al nivel máximo. La razón de concentración exacta es 0,8 mg/1.000.000 o 0,000.000.8, lo que arroja un intervalo mínimo aplicable comprendido entre 0,403 y 1,197.

Dicha modificación está en consonancia con las observaciones formuladas por los Países Bajos y Noruega durante la primera ronda del grupo de trabajo para las biotoxinas y concuerda con los resultados de la hoja de cálculo Codex, citada por Noruega, elaborada por el Comité Nórdico sobre Análisis de Alimentos.

Cabe señalar que la ecuación de Horwitz/Thompson, a partir de la cual se ha realizado este cálculo, genera una curva continua derivada empíricamente que representa la RSD interlaboratorios pronosticada versus la razón de concentración del analito; por tanto, resulta apropiado utilizar la razón de concentración más próxima o la exacta.

Cabe señalar que con esta corrección se permite la utilización del método AOAC 959.08 (bioensayo en ratón), que arroja resultados satisfactorios dentro de dicho intervalo.

Toxicidad total, Precisión en LM. Cambiar el criterio de la RSD_R de “.44 %” a “33 %”

Fundamento: al usarse la razón de concentración exacta (0,000.000.8), el cálculo de la precisión (Manual de Procedimiento del Codex, 19ª edición, pág. 58) genera una RSD_R máxima = 33,1 % (véase la observación anterior referente al intervalo mínimo).

Grupo del ácido domoico

Ácido epidomoico. Suprimir este análogo de la lista de toxinas.

Fundamento: en la Norma para los bivalvos se establece un nivel máximo solo para el ácido domoico. No se puede incluir el ácido epidomoico en los criterios sin modificar la disposición de la Norma relativa a los LM.

El ácido epidomoico se encuentra en la naturaleza en concentraciones muy bajas en comparación con el ácido domoico, el cual supera el nivel máximo antes de que se pueda cuantificar el epidomoico. No existe método validado ni factor de equivalencia tóxica establecido para el ácido epidomoico.

Grupo del ácido okadaico

Añadir los siguientes factores de equivalencia tóxica. A saber:

Toxina	Factores de equivalencia tóxica
OA	1
DTX1	1
DTX2	0,6
Ésteres del OA, DTX1 y DTX2 (ÉSTERES-FA)	Original FET

Fundamento: es necesario incluir los FET. Estos FET proceden de “Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues”, boletín de la AESA (2008), número 589, 1-62.

Lista de toxinas: OA, DTX1, DTX2. Añadir la siguiente nota:

“Los métodos de análisis para múltiples análogos deben cuantificar estos analitos”

Fundamento: explicar la utilidad de la lista y ser coherentes con la nota referente a los ÉSTERES-FA.

ÉSTERES-FA, “El método debe detectar este analito directamente o tras una fase de hidrólisis”.
Modificar como sigue:

“Los métodos para la detección de múltiples análogos deben cuantificar ~~detectar~~ este analito directamente o tras una fase de hidrólisis”

Fundamento: si dichos análogos pueden contribuir a la toxicidad total deben cuantificarse. Los métodos basados en la actividad molecular no necesitan cuantificar toxinas específicas.

Grupo de azaspirácidos

Añadir los siguientes factores de equivalencia tóxica:

Toxina	Factores de equivalencia tóxica
Azaspirácido-1 (AZA1)	1
Azaspirácido-2 (AZA2)	1,8
Azaspirácido-3 (AZA3)	1,4

Fundamento: es necesario incluir los FET. Estos FET proceden de “Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – azaspiracids”, boletín de la AESA (2008), número 723, 1-52.

Lista de toxinas. Añadir la disposición siguiente:

“Los métodos de análisis para múltiples análogos deben cuantificar estos analitos”.

Fundamento: explicar la utilidad de la lista.

Grupo de la brevetoxina

Lista de toxinas. Añadir la siguiente nota a la lista de toxinas:

“Aún falta por determinar los derivados que pueden contribuir a la toxicidad total del grupo de la brevetoxina en moluscos.

Fundamento: las brevetoxinas 1 y 2 están derivatizadas en los moluscos bivalvos y pueden ser insignificantes. Las brevetoxinas derivatizadas significativas dependen de la especie de bivalvos y se han de determinar.

Nivel máximo: incluir el nivel máximo en unidades ratón (UR) junto a los equivalentes BTX-2 entre paréntesis:

“74 – 326 UR (0,26 – 1,34 mg BTX2 eq.)”

Fundamento: en la Norma para los bivalvos se establece el nivel máximo para la brevetoxina en unidades ratón y debería aparecer del mismo modo en los criterios. El bioensayo en ratón es el método principal aceptado por la American Public Health Association y el recomendado en el informe de la Consulta de Expertos especial FAO/IOC/OMS. En aras de la coherencia terminológica, se usa “BTX2” en lugar de “PbTx-2”.

Apéndice 1: Anteproyecto revisado de criterios de rendimiento

I-8.6 Determinación de biotoxinas

I-8.6.1 Criterios Generales

(i) Los métodos de referencia se elegirán con arreglo a lo establecido en la Sección I-8.6.2 (Criterios numéricos para la selección de métodos) y en la Sección I-8.6.3 (Aplicación de criterios numéricos para la selección de métodos) y de conformidad con los “Criterios generales para la selección de métodos de análisis” y con los “Criterios generales para seleccionar métodos de análisis validados por un solo laboratorio”, ambos contenidos en el *Manual de Procedimiento del Codex*.

(ii) El método seleccionado debería elegirse en base a su practicabilidad y se debería dar preferencia a los métodos cuya aplicabilidad favoreciera la ejecución sistemática del método.

I-8.6.2 Criterios numéricos para la selección de métodos

Grupo	Toxina	Factores de equivalencia tóxica	Nivel máximo/kg en la carne de molusco	Intervalo mínimo aplicable	Precisión (RSD _R)	Porcentaje de recuperación
Grupo de las saxitoxinas (STX)	Toxicidad total		≤ 0,8 miligramos (2HCL) de equivalente de saxitoxina	0,4 – 1,2	33 %	70 – 120
	Saxitoxina (STX)	1,000	Cuando estas toxinas estén presentes y contribuyan a la toxicidad total, los métodos de análisis para múltiples análogos deben cuantificar estos analitos directamente o, en caso de que no se disponga de patrones para las toxinas N-sulfocarbamoil, la cuantificación se realizará de forma indirecta mediante hidrólisis.			
	Neosaxitoxina (NEO)	0,924				
	Decarbamoil-saxitoxina (dcSTX)	0,513				
	Decarbamoil-neosaxitoxina (dcNEO)					
	Goniautoxina-1 (GTX1)	0,994				
	Goniautoxina-2 (GTX2)	0,359				
	Goniautoxina-3 (GTX3)	0,638				
	Goniautoxina-4 (GTX4)	0,726				
	Goniautoxina-5 (B1)	0,064				
	Goniautoxina-6 (B2)					
	Decarbamoil-goniautoxina-2 (dcGTX2)	0,154				
	Decarbamoil-goniautoxina-3 (dcGTX3)	0,377				
	N-sulfocarbamoil-goniautoxina)	0,013				
	N-sulfocarbamoil-goniautoxina-2 (C1)	0,006				
	N-sulfocarbamoil-goniautoxina-3 (C2)	0,096				
N-sulfocarbamoil-goniautoxina-4 (C4)	0,058					
Hidroxibenzoatos (GC1-6)			Es necesario determinar la contribución de los hidroxibenzoatos a la toxicidad total en los bivalvos.			

Grupo del ácido okadaico (OA)	Toxicidad total		≤ 0,16 miligramos de equivalente de ácido okadaico	0,05 – 0,27	44 %	70 - 120
	Ácido okadaico (OA)	1,0	Los métodos de análisis para múltiples análogos deben cuantificar estos analitos.			
	Dinofisistoxina-1 (DTX1)	1,0				
	Dinofisistoxina-2 (DTX2)	0,6				
Grupo de las brevetoxinas (BTX)	Toxicidad total		≤ 200 unidades ratón o 0,8 miligramos de equivalente de BTX2	74 – 326 UR (0,26 – 1,34 mg BTX2 eq.)	44 %	70 - 120
	Brevetoxina-1 (BTX1)		Aún falta por determinar los derivados que pueden contribuir a la toxicidad total del grupo de la brevetoxina en moluscos.			
	Brevetoxina-2 (BTX2)					
	Brevetoxina-1, derivados (devBTX1)					
Grupo de los Azaspirácidos (AZP)	Toxicidad total		≤ 0,16 miligramos de equivalente de AZA1	0,05 – 0,27	44 %	70 - 120
	Azaspirácido-1 (AZA1)	1,0	Los métodos de análisis para múltiples análogos deben cuantificar estos analitos.			
	Azaspirácido-2 (AZA2)	1,8				
	Azaspirácido-3 (AZA3)	1,4				

I-8.6.3 Aplicación de criterios numéricos para la selección de métodos:

Todos los métodos:

- i. Todos los métodos deben cumplir los criterios relativos a la toxicidad total.
- ii. La evaluación de la conformidad se realizará empleando materiales de referencia certificados.

Métodos de análisis para múltiples análogos:

- i. Se deben validar todos los métodos para todos los análogos de toxinas que puedan contribuir a la toxicidad total de la muestra y se deben utilizar para detectar dichos análogos.
- ii. Al aplicar el método se deben usar materiales de referencia certificados para cada analito.
- iii. Para calcular la toxicidad total se deben usar los factores de equivalencia tóxica (FET) descritos en la Sección I-8.6.2. Para las toxinas que no dispongan de FET, se utilizarán FET reconocidos internacionalmente.
- iv. Determinar que los métodos cumplen los criterios de “intervalo mínimo aplicable de toxicidad total”: la suma de los límites de cuantificación validados (expresados en equivalentes tóxicos) para cada análogo de toxina que pueda contribuir a la toxicidad total de la muestra no debe superar el límite inferior del criterio de intervalo mínimo aplicable de toxicidad total.
- v. Determinar que los métodos se ajustan a los criterios de “precisión de la toxicidad total”: la precisión de la toxicidad total (RSD_R), para una muestra con nivel máximo se calcula aplicando los datos de validación de la RSD_R de los análogos individuales a las concentraciones encontradas en la muestra.

Ejemplo (se asume que las varianzas de los análogos son independientes):

$$RSD_{R \text{ toxicidad total}} \text{ estimada} = \text{sd}\{a.+b.+c.\dots\} / \text{equivalentes totales en mg/kg} \times 100$$

$$\text{sd}\{a.+b.+c.+.\dots\} = \sqrt{\text{sd}\{a\}^2 + \text{sd}\{b\}^2 + \text{sd}\{c\}^2 + \dots}$$

$\text{sd}\{a\}$ = desviación típica interlaboratorios para la toxina $\{a\}$ (calculada tras la conversión a equivalentes tóxicos) con respecto a la concentración registrada en la muestra.

Nota: $\text{sd}\{a\}$ se puede estimar aplicando la $RSD_{R\{a\}}$ de validación a la concentración más próxima del analito. Por ejemplo: $\text{sd}\{a\} = RSD_{R\{a\}} \times \text{equivalentes en mg}\{a\}/\text{kg} \div 100$

- vi. Determinar que los métodos cumplen los criterios de “recuperación de la toxicidad total”: la recuperación de la toxicidad total es un promedio ponderado de los valores de recuperación correspondientes a los análogos individuales en la matriz de la muestra, ponderado por las cifras de equivalencia tóxica de la muestra.