

comisión del codex alimentarius



ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES
UNIDAS PARA LA AGRICULTURA
Y LA ALIMENTACIÓN

ORGANIZACIÓN
MUNDIAL
DE LA SALUD



S

OFICINA CONJUNTA: Viale delle Terme di Caracalla 00100 ROMA Tel: 39 06 57051 www.codexalimentarius.net Email: codex@fao.org Facsimile: 39 06 5705 4593

Tema del Programa 11 (a)

CX/RVDF 03/10
Noviembre del 2002

PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS

COMITÉ DEL CODEX SOBRE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS

Decimocuarta Sesión

Washington, D.C., EE.UU., 4-7 de marzo del 2003

REVISIÓN DE LOS CRITERIOS BASADOS EN EL RENDIMIENTO DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LOS RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS

Se invita a los gobiernos y organizaciones internacionales que deseen enviar comentarios sobre el siguiente tema que lo hagan **a más tardar el 3 de febrero de 2003**, a: Oficina del Codex de los Estados Unidos, Servicio de Seguridad e Inspección de los Alimentos, Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Room 4861, South Building, 14th and Independence Avenue, S.W., Washington, DC 20250, USA (Fax No: +1.202.720.3157; e-mail: uscodex@usda.gov), con una copia a la Secretaria de la Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia (Telefax: +39.06.5705.4593; E-mail: Codex@fao.org).

INTRODUCCIÓN

1. La duodécima sesión del Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CCRVDF) aceptó la propuesta del Grupo de Trabajo *ad hoc* sobre los Métodos de Análisis y Toma de Muestras para revisar los criterios para la validación de los métodos analíticos para complementar los programas existentes con criterios para la validación del método analítico en un solo laboratorio. La decimotercera sesión del CCRVDF realizada en Charleston, Carolina del Sur, en diciembre del 2001 estableció una parte encargada de elaborar un documento preliminar que fuera estudiado durante la decimocuarta sesión del Comité.
2. Dos consultores expertos (Viena, 1998¹; Miskolc, 1999²) han reconocido que debería reconocerse un enfoque de validación de un solo laboratorio como un medio viable para identificar métodos que deberían ser adecuados para usarse en un programa regulador para apoyar las recomendaciones para los Límites Máximos de Residuos (MRL) especificados por la Comisión del Codex Alimentarius.
3. Estos consultores no solo recomendaron las especificaciones técnicas que deberían tomarse en cuenta en la evaluación del método analítico en un solo laboratorio, sino también reconocieron que los laboratorios que emplean esos métodos deben estar en capacidad de demostrar la habilidad de ejecutar los métodos analíticos de una manera aceptable. Un factor clave del procedimiento de un solo laboratorio es que el laboratorio debería tener la capacidad de demostrar su pericia analítica, procedimientos de aseguramiento de la calidad y calificaciones del personal que apoyará la autoridad de sus conclusiones analíticas. El procedimiento de un solo

¹ Validación de los métodos analíticos para el control de los alimentos, FAO Documento sobre Alimentos y Nutrición 68, Roma, 1998.

² Informe de la Consulta Conjunta de Expertos de FAO/IAEA sobre los Procedimientos Prácticos para la Validación del Rendimiento del Método de Análisis de Residuos de Pesticidas y Medicamentos Veterinarios y Contaminantes Traza Orgánicos en los Alimentos, (<http://www.iaea.org/trc>).

laboratorio considera que el rendimiento del método es un resultado directo de la competencia del laboratorio que ofrece el servicio analítico.

4. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada³ publicó recientemente un documento guía sobre la validación de métodos de un solo laboratorio, *Directrices Armonizadas para la Validación de Métodos de Análisis de un Solo Laboratorio*, como un informe técnico.

5. El Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras (CX/MAS 02/11) propuso para el estudio los requisitos para el uso de la validación de métodos de un solo laboratorio.

6. Al reconocer que el punto principal es la aceptación mutua de los datos de laboratorio, la propuesta reconoce que el método y los resultados obtenidos deben ser vistos dentro del contexto de los laboratorios que funcionan en un ambiente de laboratorio acreditado, y el cual respeta las directrices sobre el aseguramiento de calidad, pruebas de competencia y la validación del método de un solo laboratorio. La aceptabilidad de los resultados obtenidos usando los métodos validados de un solo laboratorio puede demostrarse por medio del calibrado, utilizando materiales de referencia, comparaciones con otros métodos que tienen un rendimiento bien definido o la participación sistemática en las pruebas de competencia. Se han propuesto las siguientes condiciones para sean agregadas al *Manual de Procedimientos* para establecer los criterios para los casos en donde pueden usarse los métodos validados de un solo laboratorio:

- i. Ningún método validado entre laboratorios es apropiado.
- ii. Los métodos validados de un solo laboratorio deben cumplir los siguientes criterios:
 - El método se valida de acuerdo con un protocolo reconocido internacionalmente (por ejemplo, el protocolo de la IUPAC que se menciona anteriormente).
 - El uso del método forma parte de un sistema de aseguramiento de LA calidad que está siendo acreditado.
 - Se hace referencia externa al menos por la participación sistemática en los esquemas de competencia. Se puede obtener referencia externa adicional por medio del calibrado usando materiales de referencia y la comparación de resultados con aquellos obtenidos empleando otro método.

7. El Comité del Codex sobre Residuos de Pesticidas (CCPR), en su trigésimo cuarta reunión en abril del 2002, avanzó en el análisis de las enmiendas propuestas para las Directrices sobre la Buena Práctica de los Laboratorios en cuando al Análisis de Residuos de Pesticidas al Paso 5 del proceso del Codex (Alinorm 01/24, Apéndice VI). Estas enmiendas incluyen conceptos y recomendaciones elaborados por la Consultoría de la AOAC/FAO/IAEA/IUPAC en Miskolc en 1999, publicado por el Centro de Capacitación de la Agencia de Energía Atómica en su página web (<http://www.iaea.org/trc>). Este trabajo continuará en la próxima reunión del CCPR.

CRITERIOS DEL MÉTODO

8. Las especificaciones para la evaluación de los métodos analíticos tal como fueron preparados anteriormente por la CCRVDF en el Codex Alimentarius, Volumen 3 *Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos* (2^{da} edición, 1994) son consistentes con los puntos de vista preparados por estas consultorías más recientes. Por ejemplo, el siguiente es el conjunto de atributos o propiedades que se considera determinan la utilidad de un método analítico.

- i. especificidad
- ii. precisión
- iii. sesgo o error sistemático
- iv. exactitud

³ Thompson, M., Ellison, S.L.R. & Wood, R. (2002) *Pure Appl. Chem. (Química Pura Aplicada)*. 74: 835-8552

- v. límite de detección
- vi. sensibilidad del método
- vii. viabilidad de uso
- viii. aplicabilidad de los tejidos/especies
- ix. límite de cuantificación
- x. respuestas falso positivo/falso negativo

9. El *Manual de Procedimientos* (12^{ma} edición, 2001) lista los criterios para los métodos que primordialmente se pretende sean métodos internacionales para la verificación de las disposiciones en las normas del Codex, y que normalmente se derivan de un estudio de colaboración entre laboratorios. Éstos son:

- i. especificidad
- ii. exactitud
- iii. precisión, repetibilidad intra-laboratorio, reproducibilidad interlaboratorios
- iv. límite de detección
- v. sensibilidad
- vi. factibilidad y aplicabilidad en condiciones normales de laboratorio
- vii. otros criterios que pueden seleccionarse, según sean necesarios.

10. Esta sección del *Manual de Procedimientos* también reconoce que es posible que sea necesario tomar en cuenta los otros criterios, e.g. factores de recuperación.

11. El CCMAS también analizará la inclusión de los criterios cambiados/adicionales (y las definiciones sugeridas) en su vigésimo cuarta Sesión (CX/MAS 02/5). Estos criterios adicionales son:

- precisión (generada por medio de datos de prueba colaborados)
- recuperación
- selectividad
- aplicabilidad
- límites de detección/determinación
- linealidad

12. El CCMAS propone que estos criterios sean usados para definir los métodos en función de las características de rendimiento, de manera que pueda hacerse una comparación significativa entre los enfoques metodológicos alternativos. Efectivamente, esto crea un ambiente apto para la aceptación de los métodos validados dentro de un solo laboratorio.

13. Los criterios identificados por la Consultoría AOAC/FAO/IAEA/IUPAC en Miskolc, que analizó el método de validación dentro de un solo laboratorio, incluyeron los siguientes:

- i. especificidad
- ii. intervalo analítico, incluyendo la recuperación por medio de la extracción, limpieza, derivación y medición
- iii. intervalo de calibrado para la determinación del analito
- iv. límite de detección
- v. límite de cuantificación
- vi. reporte del límite o nivel calibrado más bajo (LCL)
- vii. estabilidad de los analitos en los extractos de la muestra
- viii. estabilidad de los analitos durante el almacenamiento y procesamiento de la muestra
- ix. homogeneidad de los analitos en las muestras

- x. exactitud
- xi. veracidad
- xii. precisión
- xiii. selectividad
- xiv. eficiencia de la extracción
- xv. pureza de los reactivos y materiales

14. Además, la consultoría dio una orientación específica acerca de las investigaciones que se deberían llevar a cabo para determinar la adhesión a estos criterios en las dos situaciones de residuos de pesticidas y residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos.

15. Los criterios ampliados recomendados para ser incluidos en la validación enfocan algunos asuntos que normalmente serían resueltos antes de una prueba colaborada o interlaboratorios (es decir, estabilidad de los analitos, homogeneidad de la muestra, especificaciones de pureza para los reactivos y materiales), así como la introducción de las consideraciones prácticas de las especificaciones para el intervalo de calibrado necesario.

16. El apoyo de un MRL exige que un método que proporciona resultados cuantitativos debe tener un buen desempeño en el control estadístico dentro del intervalo analítico que equipara al MRL. En esos casos, es posible que sea más importante el desempeño del método dentro de ese intervalo y la inclusión de puntos de calibrado adecuados (incluyendo el nivel calibrado más bajo o LCL) que una caracterización de un límite de detección o límite de cuantificación.

17. También se consideró crítico el asunto de la selectividad del método (también conocida frecuentemente como especificidad) y, en especial, la capacidad de un método de ofrecer una identificación inequívoca de un analito y se reconoció el trabajo reciente para establecer un número mínimo de puntos de identificación que deberían exigirse para dar confianza en un resultado confirmatorio.

CATEGORÍAS DE LOS MÉTODOS ESTUDIADOS POR LA CCRVDF

18. El Codex Alimentarius, Volumen 3, *Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos* (2^{da} edición, 1994), identifica tres categorías de métodos analíticos para ser usados en un programa de control de residuos o para determinar el cumplimiento con los límites máximos de residuos del Codex (CAC/GL 16-1993 Parte III). Estos son métodos de Nivel I, los cuales están dirigidos a identificar y cuantificar un analito, y los métodos de Nivel II dirigidos a cuantificar, pero no a identificar un analito de manera inequívoca, y los métodos de Nivel III, los cuales determinan la presencia o ausencia de un compuesto en el nivel de interés o por arriba de éste. Los métodos de Nivel III comúnmente se conocen como métodos de revisión. Los métodos de Nivel II son determinativos y los métodos de Nivel I son confirmatorios. Los métodos de Nivel I, II y III, en términos generales, se aproximan a los métodos de Tipo II, III y IV, según lo promulgado por la CCMAS.

19. Cada categoría de método requiere que se determine la conformidad con un conjunto de criterios de desempeño que normalmente serían preparados a través de una prueba multilaboratorios. Actualmente, la CCRVDF define un método validado como “un método analítico que ha estado sujeto a un estudio multilaboratorio en cuanto a la exactitud, precisión, reproducibilidad, rendimiento y resistencia” (CAC/MISC 5 – 1993). En caso de ausencia de esa información, la visión contemporánea es que sería aceptable una validación de un solo laboratorio realizada de acuerdo con los principios analizados anteriormente, con una revisión adecuada de un igual (Viena. 1998; Miskolc, 1999).

20. Existe un elemento, estabilidad de la muestra en condiciones normales de almacenamiento, que es común entre todas las categorías de los métodos y debe determinarse en todos los casos. Esta propiedad debería determinarse usando las muestras recopiladas, transportadas y almacenadas antes del análisis en condiciones que sean representativas de las condiciones bajo las cuales el laboratorio normalmente procesaría las muestras. Una vez que se ha obtenido esta información, no es necesario repetir las investigaciones para los diferentes métodos o categorías de métodos, a menos que haya un cambio importante en las condiciones asociadas con el uso del método.

DEFINICIONES

Criterios mínimos de validación para tratar los métodos de Nivel III

21. En el caso de los métodos de Nivel III o “revisión”, es necesario demostrar la fiabilidad estadística del rendimiento del método en la concentración considerada crítica para la detección de analitos, usualmente un MRL. Los siguientes son los parámetros de rendimiento que se deben valorar, para cada tipo de material de muestra (por ejemplo, hígado de res, músculo de res, músculo de oveja, leche de vaca) a ser probados para el analito meta:

- i. **Selectividad**, definida en el CX/MAS 02/5 como el “grado al cual un método puede determinar un(os) analito(s) en particular en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes. La selectividad es el periodo recomendado en la química analítica para expresar el grado al cual un método particular puede determinar un(os) analito(s) en la presencia de interferencias de otros componentes. La selectividad se puede clasificar. Se debe desestimar el uso del término especificidad para el mismo concepto, ya que a menudo causa confusiones”

El AOAC Performance Tested Program™ (Programa Probado del Rendimiento de la AOAC) para los kits de prueba requiere que se demuestre al menos el 90% de selectividad con 95% de confianza en la muestra libre de residuos probada para analizar la presencia del analito buscado. Esto se determina experimentalmente al probar un mínimo de 30 materiales de muestras libres de residuos que provienen, al menos, de seis fuentes diferentes (es decir, al menos cinco duplicados de cada una de por lo menos seis fuentes), todos los cuales deberían dar un resultado negativo. Tres resultados positivos o más constituyen un fracaso de la prueba de selectividad. Si uno de los resultados o más es positivo, el experimento debería repetirse y dos resultados positivos constituirían un fracaso.

Otras organizaciones o autoridades han preparado otros requisitos. Por ejemplo, la OIE recomienda 1000 pruebas negativas (ver http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00013.htm); en tanto se exige que los métodos de revisión usados de conformidad con la Directriz de la UE 96/23/EC sean “validados y tengan una tasa de falso cumplimiento de <5% (\exists -error) en el nivel de interés (vez Decisión de la Comisión 2002/657/EC).

- ii. **Sensibilidad** para una prueba de revisión puede definirse como la concentración más baja en la cual, de manera confiable, puede detectarse un analito. En el AOAC Performance Tested Program™ para los kits de prueba, esto se determina experimentalmente al probar un mínimo de 30 materiales de muestra libres de residuos fortificados con el analito en la concentración meta. Los materiales de muestra deberían provenir al menos de seis fuentes diferentes (es decir, al menos cinco duplicados de cada una de por lo menos seis fuentes diferentes), todos los cuales deberían dar un resultado positivo cuando se fortifican en la concentración meta. Tres resultados negativos o más constituyen un fracaso de la prueba de sensibilidad. Si uno o dos de los resultados es negativo, el experimento debería repetirse y dos resultados negativos constituirían un fracaso. Si está disponible, el experimento debería repetirse con material conocido que tiene la concentración meta.
- iii. La curva **respuesta-dosis** para la prueba debería determinarse en conjunto con la prueba de sensibilidad. Esto demanda que se seleccione un intervalo de concentraciones que debería incluir la concentración meta para la detección de incumplimientos. En el AOAC Performance Tested Program™ para los kits de prueba, para cada concentración, se fortifica un mínimo de 30 materiales de muestra libres de residuos (sies fuentes) con el analito con la concentración necesaria y se determina el porcentaje de resultados positivos. La respuesta a la concentración meta para el monitoreo de incumplimientos y a concentraciones mayores debería cumplir el requisito de sensibilidad mencionado anteriormente. Una determinación exacta de respuesta-dosis debería incluir una fortificación a una concentración al menos 20% superior que la concentración “toda positiva”, la cual debería ser la concentración meta para la detección del incumplimiento.

- iv. La **resistencia** se define en el Manual de Procedimientos como la “habilidad de un proceso de medición química para resistir los cambios en los resultados cuando se someten a cambios menores en las variables ambientales y de procedimiento, laboratorios, personal, etc.”. Una prueba de revisión debería valorarse al variar los factores apropiados, tales como la cantidad de reactivo agregado, tiempo de incubación o temperatura y agudeza visual del instrumento de ensayo al determinar el punto final, para determinar cualesquier puntos de control críticos que deberían identificarse.
 - v. En el caso de las valoraciones del “kit de prueba”, se deberían indicar claramente la **condición de almacenamiento** y la **vida útil**.
 - vi. Debería determinarse la **reactividad cruzada** que es la habilidad de la prueba de generar una respuesta positiva con otros compuestos diferentes al analito meta, incluyendo metabolitos u otras sustancias, las cuales pueden estar presentes en las muestras.
 - vii. Deberían determinarse la **Interferencias** que pueden tapar, ocultar o mejorar la señal de los materiales de la muestra. Esta información puede derivarse del análisis de los materiales de las muestras vacías obtenidos de seis fuentes o más, usados en los experimentos de selectividad y sensibilidad. En el caso de las pruebas usadas para determinar los residuos en la leche, deberían valorarse las posibles interferencias de una bacteria típica y de las células somáticas.
22. Además, debería valorarse las posibles la estabilidad del analito, tanto en las normas como en las muestras en condiciones normales de análisis que requiere la prueba.

Crterios mínimos de validación para tratar los métodos de Nivel II

23. En el caso de los métodos de Nivel II o pruebas determinativas debe valorarse un conjunto más minucioso de parámetros relacionados con la fiabilidad estadística del resultado cuantitativo obtenido. Estos parámetros incluyen:
- i. La **exactitud** (también conocida como **veracidad** o **sesgo**) se define en Manual de Procedimientos como la “proximidad de concordancia entre el resultado reportado y el valor de referencia aceptado.” [El Manual de Procedimientos define **veracidad** como la “proximidad de concordancia entre el valor promedio obtenido de una serie de resultados de pruebas y un valor de referencia aceptado”. **Sesgo** se define como “la diferencia entre la expectativa de los resultados de la prueba y un valor de referencia aceptado.” **Exactitud** es, por lo tanto, la habilidad de un método de dar un resultado concordante con la concentración verdadera del analito presente en el material de la prueba. La exactitud de un método puede determinarse al analizar un material de referencia certificado, comparar los resultados con aquellos obtenidos usando otro método para el cual previamente y de manera rigurosa se han establecido los parámetros de rendimiento (es decir, un método de referencia reconocido) o, ante la ausencia de materiales o métodos de referencia, al determinar la recuperación del analito fortificado en un material de la muestra vacío conocido.
 - ii. La **recuperación** se define en el CX/MAS 02/5 como la cantidad de analito presente o agregado al material de la prueba que se extrae y se presenta para la medición. Comúnmente, se expresa como el porcentaje de analito determinado experimentalmente después de fortificar el material de la muestra a una concentración conocida y debería valorarse en concentraciones que cubran el intervalo analítico del método.
 - iii. Debería determinarse la **curva de calibrado** para valorar la respuesta del detector a las normas. Las concentraciones (mínimo cinco, más una vacía) deberían cubrir todo el intervalo del interés analítico y la curva resultante debería expresarse estadísticamente. Comúnmente, se desea una respuesta lineal y la curva se expresa estadísticamente en función de la correlación lineal. En el caso de un método determinativo, el término relacionado **sensibilidad** se define en el Manual de Procedimientos como “el cambio en la respuesta dividido entre el cambio correspondiente en la concentración de un estándar (curva de calibrado); es decir, la pendiente, s_i , de la curva de calibrado analítico”. También se ha definido como “la gradiente de la función de calibrado”³.

- iv. La **función analítica** indica la respuesta del analito recuperado del material de la muestra en diversas concentraciones a través del intervalo del interés analítico. En el caso de los analitos cuyo MRL se ha establecido en un material de la muestra particular (matriz), la respuesta comúnmente se determina para material de la muestra vacío conocido y para material de la muestra vacío fortificado a cada f 0.5x, 1.0x y 2.0x del MRL (utilice seis fuentes diferentes de materiales vacíos). El experimento de la función analítica puede combinarse con el experimento de recuperación descrito anteriormente y reviste de una importancia especial cuando la presencia de coextractores de la matriz modifica la respuesta del analito al compararse con las normas analíticas. Cada vez es más común que los métodos para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos basen la determinación cuantitativa en una curva estándar preparada al agregar una norma a un material de matriz vacío conocido y representativo a un intervalo de una concentración apropiada, la cual identifica el valor meta. El uso de esa “curva estándar de tejido” para el calibrado incorpora una corrección de recuperación dentro de los resultados analíticos obtenidos.
- v. La **linearidad** se define en el CX/MAS 02/4 como “la capacidad de un método de análisis, dentro de un cierto intervalo, para ofrecer una respuesta instrumental o resultados proporcionales a la calidad del analito a ser determinada en la muestra de laboratorio”. Esta proporcionalidad se expresa por una expresión matemática definida *a priori*. Los límites de linearidad son los límites experimentales de las concentraciones entre las cuales puede aplicarse un modelo de calibrado con un nivel de confianza conocido (generalmente, se asume que es el 1%). En el caso de un método cuyo material de la matriz vacía fortificada se usa para la cuantificación, la linearidad se determina a partir de los experimentos de función, según se describieron, y es la expresión estadística de la curva obtenida para el análisis de los materiales de la muestra fortificado en las concentraciones meta que identifican el Límite Máximo de Residuos. Comúnmente, se determina a partir de un análisis de regresión lineal de los datos, suponiendo que existe una respuesta lineal.
- vi. El **límite de detección** (CX/MAS 02/4) convencionalmente se define como un campo vacío +3s, en donde la desviación estándar de la señal vacía del campo (definición de la IUPAC). También se define como “la cantidad o concentración más pequeña de un analito en la muestra de la prueba que se puede distinguir de manera confiable desde cero”³. Comúnmente, el cálculo de la señal media para los vacíos del campo y la desviación estándar se hace con 20 o más determinaciones. Este enfoque puede dar una estimación optimista del límite de detección. Un enfoque alternativo involucra el cálculo del límite de detección de la desviación estándar $s_{y/x}$ del análisis de regresión lineal de la curva estándar generada en el experimento de la función analítica descrita anteriormente.⁴ El límite de detección se calcula utilizando el corte y de la curva más tres veces $s_{y/x}$. Este enfoque proporciona una estimación más conservadora del límite de detección.
- vii. El **límite de cuantificación**, tal como lo defina la IUPAC, es la concentración más baja de analitos en una matriz definida que puede ser determinada con la precisión y exactitud⁵ necesarias. Puede expresarse como 10 veces la desviación estándar del valor de la media para 20 o más determinaciones de la respuesta del material de la matriz vacía conocida. En el caso de los métodos usados como apoyo a los Límites Máximos de Residuos establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius, el límite de cuantificación debería cumplir con los criterios de precisión y exactitud (recuperación) indicados en el Cuadro 1. Sin embargo, dado que el límite de cuantificación de un método puede ser considerablemente más bajo que las concentraciones reales monitoreadas en cuanto a su conformidad con el Límite Máximo de Residuos, la validación y la aplicación posterior del método puede estar basado en un **nivel de calibrado más bajo**, que comúnmente es 0,5x del MRL. Para ser usados en un programa regulador, los límites de detección y de cuantificación son parámetros importantes cuando el método se aplicará para estimar las exposiciones a los residuos, en donde puede existir interés por monitorear los residuos a concentraciones por debajo del MRL. En cuanto a al conformidad del monitoreo con un MRL, es importante que se incluya un nivel de calibrado más bajo en el análisis que demuestre de manera adecuada que la concentración de MRL puede determinarse con confianza.

⁴ Miller, J.C., & Miller, J.N. (1993) *Estadística para Química Analítica*, 3rd edición, Ellis Horwood Ltd., Chichester.

⁵ *Pure & Appl. Chem.*, **68**: 1167-1193, 1996

- viii. La **precisión** se define en el Manual de Procedimientos como la “proximidad de acuerdo entre los resultados de la prueba independiente obtenidos en las condiciones estipuladas”. Se puede expresar en función de **repetibilidad** (intralaboratorio) y **reproducibilidad** (entre laboratorios). Para la validación de un método de un solo laboratorio, la precisión como repetibilidad debería determinarse de los experimentos realizados en días diferentes, usando diferentes lotes de reactivos y preferiblemente realizados por diferentes analistas. Puede hacerse una estimación inicial de la repetibilidad a partir de los datos generados durante los experimentos de la función analítica descritos anteriormente. Se pueden obtener datos adicionales de las familiarizaciones posteriores del método realizadas por otros analistas en el laboratorio. La precisión expresada como reproducibilidad requiere que se haga una prueba multilaboratorio del método. La CCMAS ha propuesto que la precisión debería generarse de las pruebas de datos colaboradas en lugar de las consideraciones de las incertidumbres de la medición (CX/MAS 02/5).
- ix. La **especificidad** se define en el Manual de Procedimientos como “la propiedad de un método para responder exclusivamente a la característica o analito definido en la norma del Codex”. Sin embargo, el CCMAS ha propuesto (CX/MAS 02/5) que el término **selectividad**, definido como “el grado al cual un método puede determinar partícula(s) de analitos en las mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes”, es “el término recomendado en la química analítica para expresar el grado al cual un método particular puede determinar el(os) analito(s) en la presencia de interferencias de otros componentes”. El análisis de materiales de la muestra vacíos conocidos también debería determinar esta propiedad. No deberían detectarse sustancias que interfieren cuando el método se aplica a materiales de la muestra comunes representativos de aquellos que serían enviados para el análisis. El método también debería tener la capacidad de discriminar el analito en la presencia de posibles sustancias que interfieren (**selectividad**), tales como otros medicamentos que se podría esperar estén presentes como residuos en las mezclas de campo comunes.
- x. El Manual de Procedimientos define **resistencia** como “la capacidad de un proceso de medición química para resistir al cambio en los resultados cuando se somete a cambios menores en las variables ambientales y de procedimiento, laboratorios, personal, etc.”]. La prueba de **resistencia** debería realizarse usando el enfoque de diseño factorial estándar para determinar cualquier punto de control crítico⁶. Los factores comunes que se deben incluir en un diseño incluyen las variaciones en los volúmenes o concentraciones del reactivo, pH, incubación o tiempo de reacción y temperatura, calidad del reactivo y un lote o fuente diferente del reactivo o material cromatográfico.
- xi. Debería valorarse la **estabilidad del analito** de las normas y durante el procesamiento de las muestras. También debería determinarse la estabilidad del analito en condiciones comunes del almacenamiento de la muestra antes del análisis, incluyendo cualquier periodo para el cual se haya dejado pendiente un posible reanálisis con fines de confirmación.

Cuadro 1. Criterios de Rendimiento Actual para los Métodos para el Análisis de Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CAC/GL 16 - Codex Alimentarius, Volumen 3)

Concentración	CV(%) Repetibilidad (dentro del laboratorio)	CV(%) Reproducibilidad (entre laboratorios)	Intervalo aceptable para la exactitud, expresado como % de recuperación
≤1 µg/kg	#30	35	50–120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	#30	30	60–120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	#20	20	70–110
> 0.1 mg/kg	#15	15	80–110

⁶ Youden, W.J., & Steiner, E.H. (1975) *Manual Estadístico de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales*, AOAC International, Gaithersburg, VA.

24. Se ha sugerido una versión revisada de estos requerimientos de desempeño, en el informe de la Consultoría de Miskolc². Estas recomendaciones se resumen en el Cuadro 2.

Table 2. Criterios para la Validación de los Métodos dentro del Laboratorio^a para el Análisis de Residuos de Pesticidas y Medicamentos Veterinarios en los Alimentos, según lo Recomienda la Consultoría de Miskolc²

Concentración	Repetibilidad		Reproducibilidad		Veracidad ^e Intervalo del % de recuperación media
	CV _A % ^c	CV _L % ^d	CV _A % ^c	CV _L % ^d	
≤1 µg/kg	35	36	53	54	50–120
> 1 µg/kg ≤ 0.01 mg/kg	30	32	45	46	60–120
> 0.01 mg/kg ≤ 0.1 mg/kg	20	22	32	34	70–120
> 0.1 mg/kg ≤ 1 mg/kg	15	18	23	25	70–110
> 1 mg/kg	10	14	16	19	70–110

- En el caso de los métodos multiresiduos, pueden existir algunos analitos con los cuales no puede cumplirse estrictamente estos criterios de desempeño cuantitativo. La aceptabilidad de los datos producidos en estas condiciones dependerá del propósito de los análisis, e.g. cuando se revisa la conformidad con el MRL, los criterios indicados deberían cumplirse hasta donde sea técnicamente posible, si bien se pueden aceptar otros datos muy por debajo del MRL con una mayor incertidumbre.
- Estos intervalos de recuperación son apropiados para los métodos multiresiduos. Para algunos propósitos, pueden necesitarse criterios más estrictos, e.g. métodos para analitos solos o residuos de medicamentos veterinarios (ver Cuadro 1).
- CV_A: Coeficiente de variación para el análisis que excluye el procesamiento de la muestra. El parámetro se puede estimar a partir de las pruebas realizadas con materiales de referencia o porciones analíticas rechazadas antes de la extracción. Un material de referencia preparado en el laboratorio puede usarse ante la ausencia de material de referencia certificado.
- CV_L: Coeficiente general de variación de un resultado de laboratorio, el cual permite hasta el 10% de variabilidad del procesamiento de la muestra.

Criterios mínimos de validación para tratar los métodos de Nivel I

25. En el caso del Nivel I o métodos confirmatorios, los criterios de rendimiento para los métodos del Nivel II aplican cuando se usa el método del Nivel III como un método determinativo. Además, debería considerarse los siguientes criterios al establecer el rendimiento del método para la identificación de analitos:

- Debe establecerse la **especificidad**, o **selectividad**, del método. Tal como se indicó arriba, aunque *Manual de Procedimientos* y el *Codex Alimentarius Volumen 3* actualmente se refieren a la **especificidad** del método, la CCMAS ha recomendado la **selectividad** como el término preferido en la química analítica para esta propiedad de un método (CX/MAS 02/5). El método debe tener la capacidad de discriminar inequívocamente entre los campos vacíos verdaderos y los materiales de la muestra que contienen el analito en concentraciones dentro del intervalo del interés analítico. Para los métodos basados en las determinaciones espectrales, comúnmente esto se expresa como la presencia de un número mínimo de aspectos característicos en los espectros obtenidos para un analito en un material de la muestra al compararse con el espectro obtenido para una norma auténtica del analito. Las metodologías de confirmación más comúnmente usadas en el análisis de los residuos orgánicos se basan en la espectrometría de masas de baja resolución en combinación con la cromatografía de gas o cromatografía líquida (GC/MS, LC/MS). Otras técnicas espectrales menos usadas incluyen la espectrometría infrarroja y la espectroscopia magnética nuclear. Comúnmente, se necesita un mínimo de cuatro puntos de identificación para cumplir con los criterios de rendimiento aceptados para los métodos reguladores. Se considera que los métodos basados en la espectrometría de masas de alta resolución dan

una mayor fiabilidad por medio de una medición más precisa de la masa que la que se puede obtener usando técnicas de espectrometría de masas de baja resolución. Los requisitos del desempeño del método para los métodos confirmatorios basados en las GC/MS y LC/MS de baja resolución, según lo publicado recientemente por la Comisión Europea⁷, se indican en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Requisitos de Desempeño para las Intensidades Relativas (Muestra Comparada con la Norma) Usando varias Técnicas Analíticas de Espectrometría de Masas⁷.

Intensidad Relativa del Ion (% del máximo de la base)	GC-MS (EI) (relativo)	GC-MS (CI), GC-MS/MS LC-MS, LC-MS/MS (relativo)
>50 %	∇10 %	∇ 20 %
> 20% to 50%	∇ 15 %	∇ 25 %
> 10% to 20%	∇ 20 %	∇ 30 %
< 10%	∇ 50 %	∇ 50 %

- ii. Debe establecerse la **estabilidad del analito** durante el análisis, tanto para las normas como el analito en presencia del material de la muestra durante el procesamiento a través del análisis completo. Debería estimarse la estabilidad del analito en muestras almacenadas si las condiciones de almacenamiento estudiadas para los métodos determinativos o de revisión no son suficientes para que incluyan las condiciones en las que pueden almacenarse las muestras, a la espera del análisis usando el método confirmatorio.
- iii. Puede necesitarse la **prueba de resistencia** si el método difiere significativamente del método determinativo previamente validado (si el método usa procedimientos de extracción o derivación a los usados en el método derivativo).

26. En el Cuadro 4 se muestran ejemplos de técnicas analíticas que pueden ser adecuadas para cumplir los criterios para los métodos analíticos confirmatorios.

Cuadro 4. Ejemplos de Métodos de Detección Adecuados para el Análisis Confirmatorio de Sustancias, según lo Recomienda la Consultoría de Miskolc²

Método de detección	Criterio
LC o GC y espectrometría de masas	Si se monitorea una cantidad suficiente de iones fragmentados
LC-DAD	Si el espectro UV es característico
LC – fluorescencia	En combinación con otras técnicas
2-D TLC – (espectrofotometría)	En combinación con otras técnicas
GC-ECD, NPD, FPD	Solo si se combina con dos o más técnicas de separación ^a
Derivación	Si no fue el método escogido en primera instancia
LC-inmunograma	En combinación con otras técnicas
LC-UV/VIS (longitud de la onda sola)	En combinación con otras técnicas

⁷ Decisión de la Comisión 2002/657/EC, al implementar la Directriz del Consejo 96/23/EC sobre el rendimiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados, *Publicación Oficial de las Comunidades Europeas*, L221/8, Agosto 17, 2002.

a) Otros sistemas cromatográficos (aplicando fases estacionarias o móviles, o ambas de diferente selectividad) u otras técnicas.

Consideraciones estadísticas en la validación de métodos

27. La fiabilidad de un método en la concentración meta en el material de la muestra, especialmente cuando se realizan pruebas sobre la conformidad con el Límite Máximo de Residuos es un aspecto importante de la validación del método y puede expresarse estadísticamente.

- a) El **error alfa** (\forall) expresa la probabilidad de que la concentración verdadera de analitos en un material de la muestra es menor al nivel de acción definido (por ejemplo, un Límite Máximo de Residuos), cuando los resultados en una o más porciones de la prueba indican que la concentración supera ese valor (falso positivo). Los valores aceptados para esta probabilidad generalmente están entre 1 y 5%. El **límite de decisión**, $CC\forall$, se define como el límite al cual la concentración del analito realmente presente en un material de la muestra sobrepasa esa concentración con una probabilidad de error de \forall ; es decir, con una probabilidad estadística de $1-\forall$. Para determinar la conformidad con un MRL, el límite de decisión usualmente se determinaría con una probabilidad estadística de 95%.
- b) El **error beta** (\exists) expresa la probabilidad de que la concentración verdadera de analitos en un material de la muestra es mayor que el nivel de acción cuando las mediciones realizadas en una o más porciones de la prueba indican que la concentración no supera ese valor (falso negativo). Los valores aceptados para esta probabilidad son entre 1 y 5%. La **capacidad de detección**, $CC\exists$, se define como la concentración verdadera más pequeña del analito que puede detectarse, identificarse y cuantificarse en una muestra con una probabilidad de error de \exists ; es decir, con una probabilidad estadística de $1 - \exists$. Para determinar la conformidad con un MRL, la capacidad de detección usualmente se determinaría con una probabilidad estadística de 95%.

OTRAS CONSIDERACIONES

28. Al seleccionar un método analítico para usarlo en un programa regulador para garantizar la conformidad con los MRL tal como lo estableció la Comisión del Codex Alimentarius, los laboratorios deberían asegurarse de que el rendimiento de los métodos seleccionados cumplan con los criterios de rendimiento indicados en el Cuadro 1 y los requisitos de sus clientes. Bajo la norma ISO-17025, también se espera que los laboratorios pondrán a disposición de los clientes información que proporcione un estimado de la medición y el resultado estimado obtenido con el método analítico. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada está desarrollando orientaciones internacionales sobre la incertidumbre de las mediciones. Sin embargo, hasta que el documento no esté terminado, la realización de experimentos para valorar los criterios descritos anteriormente proporcionará al laboratorio información derivada estadísticamente para que la entregue a los clientes sobre el rendimiento del método y la fiabilidad de los resultados.

29. Al determinar los requisitos para la validación del método dentro de un laboratorio, deberían considerarse los siguientes puntos:

- i. Cuando se seleccionan los métodos para el desarrollo que se han validado previamente por medio de un estudio de colaboración entre laboratorios, no se necesita de una validación completa del método dentro del laboratorio. En su lugar, el laboratorio debe demostrar que los analistas que emplean el método pueden cumplir con los criterios de desempeño para el método, según se definió en el informe del estudio colaborado. Cualquier dato sobre asuntos específicos que no esté disponible en el informe del estudio colaborado, por ejemplo, estabilidad de la muestra y del analito en condiciones comunes de almacenamiento y análisis en el laboratorio y el programa regulador que apoya, puede necesitar de investigación adicional. Debe validarse completamente cualesquiera modificaciones, sustituciones u otras variaciones del método que se estudió en forma colaborada.
- ii. Los métodos que se han validado en uno o más laboratorios antes de transferirlos a un nuevo laboratorio usuario pueden no necesitar de una validación adicional si hay disponible un informe de validación

completo para el nuevo usuario. De nuevo, en cuanto a la implementación de método de estudio colaborado, el laboratorio debe demostrar que los analistas que usan el método pueden cumplir con los criterios de desempeño para el método establecidos por los usuarios originales, tal como se documenta en el informe de validación. Cualquier dato sobre asuntos específicos que no estén disponibles en el informe de validación, tales como estabilidad de la muestra y del analito en condiciones comunes de almacenamiento y análisis en el laboratorio y el programa regulador que apoya, puede necesitar de investigación adicional. Debe validarse cualesquiera modificaciones, sustituciones u otras variaciones del método que se estudió en forma colaborada.

- iii. La ampliación de un método de validación a matrices o analitos adicionales debería validarse de manera apropiada. Los asuntos que se deben tratar incluirán, la estabilidad del analito en la nueva matriz (o estabilidad del nuevo analito), libertad de interferencias, más la recuperación, precisión y linealidad de respuesta para los métodos determinativos.
- iv. Cualesquiera modificaciones o cambios que se hagan a un método después de la validación inicial deberían validarse, y los resultados de la revalidación deberían documentarse.

30. La validación del método es el comienzo de un proceso, no el fin en sí mismo. Los laboratorios deben contar con un sistema de aseguramiento de la calidad que demuestre que los métodos y los analistas que los usan continúan cumpliendo con los criterios de desempeño establecidos durante la validación del método. La evidencia de esto puede proporcionarse a través de actividades de aseguramiento de la calidad, las cuales incluyen el reanálisis de las muestras, el análisis de las muestras de revisión interna y la participación en programas de competencia.

RECOMENDACIONES:

31. En consideración a las deliberaciones de las continuas discusiones dentro de la CCMAS y CCPR, en relación con la validación del método de un solo laboratorio, el Grupo de Trabajo *ad hoc* sobre los Métodos de Análisis y Toma de Muestras debe tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- i. El nuevo trabajo recomendado por la decimotercera Sesión del CCRVDF para revisar el CAC/GL 16-1993, y para preparar el documento preliminar revisado de las “Directrices para el Establecimiento de un Programa Regulador para el Control de Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos” incluye una reseña y revisión de la “Parte II, Consideraciones Generales sobre los Métodos Analíticos para el Control de Residuos”, los cuales tratan sobre los criterios para la selección de métodos analíticos apropiados para usarlos en un programa regulador, para reflejar el enfoque de validación del método de un solo laboratorio. Tal enmienda estaría basada en los contenidos de este documento de trabajo y en el trabajo que realiza actualmente la CCMAS, CCPR e IUPAC.
- ii. Que el Grupo de Trabajo continúe armonizando los procedimientos para la identificación de métodos apropiados de análisis para apoyar los MRL del Codex con aquellos procedimientos desarrollados por la CCMAS y CCPR.
- iii. Que el Grupo de Trabajo recomendó al Comité (CCRVDF) el principio básico de que los detalles de orientación adicionales asociados a los métodos analíticos (incorporados en el CAC/GL 16-1993 y las directrices posteriores) deberían servir, cuando sea posible, como referencias para las normas y directrices disponibles preparadas con el auspicio de las organizaciones científicas internacionales relevantes, tales como la IUPAC, Iso y AOAC International.
- iv. Si el Comité considera que se deben suministrar instrucciones más detalladas a los miembros para poner en práctica los procedimientos de validación del método apropiado, el Comité puede estudiar la adopción de un documento orientador desarrollado a partir de las recomendaciones de la Consultoría FAO/IAEA en Miskolc, con respecto a los criterios y orientaciones prácticas para la validación de métodos analíticos para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. (Hubo un documento preliminar disponible para los miembros, como un documento de consulta en la Decimotercera Sesión, y el Grupo de Trabajo analizará los comentarios cuando se reúna antes de la Decimocuarta Sesión. Este documento es el

resultado de una asignación grupal para la preparación de un documento preliminar [Australia, Canadá, Costa Rica, Francia, los Países Bajos, Estados Unidos, COMISA] de la decimosegunda Sesión de la CCRVDF y puede ser desarrollado aún más y finalizado por el Grupo de Trabajo si el Comité opina que se necesita ese documento.)