



Tema 3 del Programa

CX/FFP 14/33/5

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

Trigésima tercera reunión

Bergen, Noruega

17 – 21 de febrero de 2014

**PROYECTO DE CRITERIOS DE RENDIMIENTO PARA LOS MÉTODOS DE REFERENCIA Y
CONFIRMACIÓN PARA BIOTOXINAS MARINAS (SECCIÓN I-8.6 DETERMINACIÓN DE
BIOTOXINAS) EN LA NORMA PARA LOS MOLUSCOS BIVALVOS VIVOS Y CRUDOS
(En el Trámite 6 del Procedimiento)**

Observaciones enviadas por Australia, Noruega y Nueva Zelandia

AUSTRALIA

Australia desea agradecer al Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras (CCMAS) por haber examinado el Proyecto de Criterios de Rendimiento y por las observaciones formuladas. Resultan de particular importancia para el debate:

1. La opinión del CCMAS de que el Bioensayo en Ratones es un método de Tipo I.
2. El reconocimiento por parte del CCMAS de que resulta preciso adaptar los criterios de evaluación de los métodos para los métodos de múltiples analitos.
3. La decisión del CCMAS de incluir los factores de equivalencia tóxica (FET) en el Apéndice VII.
4. El reconocimiento por parte del CCMAS de que no están enumerados todos los análogos de toxinas para las toxinas paralizantes de los moluscos (PST).
5. La solicitud del CCMAS de que se incluya una descripción sobre la manera en que se calculará la toxicidad total.

El bioensayo en ratones como método de Tipo I

El CCMAS ha dejado en claro que el bioensayo en ratones constituye un método de Tipo I (REP 13/MAS, párrafo 23). Tras deliberaciones con el representante australiano del CCMAS, aceptamos esta aclaración y comprendemos que la clasificación como método de tipo I se relaciona con aspectos del método que forman parte de su esencia y que, por ende, no pueden replicarse por medio de la química analítica. En otras palabras, el bioensayo en ratones constituye el único método para establecer el *nivel de biotoxinas marinas en unidades ratón*, no el único método para establecer la presencia de biotoxinas marinas.

Australia entiende que, a raíz de esta clasificación, este grupo de trabajo ya no debería tener en cuenta el bioensayo en ratones, puesto que, en la página 69 del Manual de Procedimiento del CAC (20ª edición), se expresa que la selección de métodos en base al planteamiento de criterios es pertinente para los métodos Tipo II y Tipo III del Codex.

Señalamos que, si bien, en el futuro el bioensayo en ratones podrá verse sustituido como método de confirmación, los países que opten por hacerlo así podrán utilizarlo, de todos modos, como instrumento de regulación.

Reconocimiento por parte del CCMAS de que resulta preciso adaptar los criterios de evaluación de los métodos para los métodos de múltiples analitos

El CCMAS hizo notar que "los criterios del manual de procedimiento solo podían aplicarse a analitos individuales", algo que ha representado varios problemas para el Comité del Codex sobre Pescado y Productos Pesqueros (CCFFP) en el proceso de elaborar los criterios de rendimiento. Sin embargo, si bien Australia ve con agrado que el CCMAS haya expresado en los párrafos 25 y 47 que estudiará, desde un punto de vista general, la elaboración de criterios para la determinación de la toxicidad total aplicables a los métodos de múltiples analitos, opinamos que esperar el resultado de este proceso ocasionará una demora considerable en la elaboración de los Criterios de Rendimiento. Por lo tanto, Australia preferiría que la labor sobre los Criterios de Rendimiento continuara en simultáneo con el debate en el CCMAS.

Inclusión de los factores de equivalencia tóxica (FET) en el Apéndice VII

El CCMAS ha solicitado información sobre los FET para todos los análogos de toxinas enumerados (REP 13/MAS, párrafo 26). No obstante, Australia sigue siendo de la opinión de que, dado el rápido avance de la ciencia en esta área, es preciso adoptar un enfoque distinto.

La confiabilidad y validez de la base de conocimiento de la que se dispone hoy en día acerca de los FET de la saxitoxina es objeto de un amplio debate, y constituye, probablemente, la principal debilidad de la actual capacidad de determinar la inocuidad de los moluscos por medio de la identificación y cuantificación cromatográfica de los congéneres conocidos. Un artículo reciente de Munday y Reeve (2013) ofrece un panorama general del estado de la cuestión y examina los supuestos que se utilizaban en el pasado, pero que se tornan cada vez más discutibles a medida que se incrementa la labor sobre este tema. Esencialmente, es inexacto realizar predicciones sobre la toxicidad oral a partir de investigaciones intraperitoneales. Hace poco, Munday et al. (2013) publicaron información sobre la toxicidad oral aguda de ciertos análogos de la saxitoxina, tema sobre el cual se continúa trabajando.

Los problemas que implica adoptar los actuales enfoques basados en los FET para la realización de ensayos de inocuidad en los alimentos de origen marino mediante métodos químicos también son objeto de análisis en Botana et al. (2010) y en el dictamen del panel de expertos de la EFSA sobre compuestos del grupo de las saxitoxinas (2009).

Se está alcanzando un conocimiento más exacto de la toxicidad relativa de los diversos análogos de la saxitoxina. Inicialmente, están contribuyendo a obtener este conocimiento modelos animales apropiados que se valen de efectos finales de toxicidad adecuados y tamaños de muestra eficaces. Este conocimiento redundará en el mutuo beneficio de la seguridad pública y de la industria de los alimentos de origen marino; sin embargo, llevará cierto tiempo llegar hasta este punto.

Dados los progresos actuales en este campo, Australia mantiene su opinión de que es preferible la sugerencia realizada anteriormente por el CCFFP, en el sentido de que la FAO publique esta información en una página web que resulte más fácil de actualizar. Australia sugiere que se añada una nota al Apéndice VII de REP 13/FFP para permitir la incorporación de esta información al documento, siempre que este tema se resuelva científicamente y cuando ello ocurra. La redacción específica de dicha nota se detalla en las observaciones formuladas más abajo.

Análogos de toxinas PST

El CCMAS señaló que el método AOAC 2005.06 abarcaba solo 12 de los 16 análogos de la saxitoxina enumerados en el Cuadro 2 (REP 13/MAS, párrafo 21). Australia hace notar que, de hecho, existen muchas más de 16 PST; el Dictamen Científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre las Biotoxinas Marinas señala que hay más de 30, mientras que Weise et al. establece en 2010 que existen 57 análogos. En Lawrence et al. (2011) se sugiere que deberían considerarse como insignificantes los análogos que estén presentes en una proporción inferior al 5% de la cantidad total de toxinas.

Australia señala que el Cuadro 2 del Apéndice VII del documento REP 13/FFP lleva el título "Análogos de toxinas a *considerarse*" y enumera toxinas que es frecuente encontrar. Australia entiende que no debe interpretarse esta enumeración como exhaustiva. En lugar de ello, cada autoridad competente debería evaluar los congéneres de STX presentes en su área y garantizar su correcta evaluación, como se detalla en las observaciones contenidas en el método. A fin de clarificar este punto, Australia propone que se añadan al texto orientaciones sobre las medidas adecuadas para el caso de que se identifiquen congéneres durante el análisis (véanse las observaciones formuladas más adelante).

Cálculo de la toxicidad total en base a los diferentes análogos

El CCMAS ha solicitado que el CCFFP proporcione información sobre los FET y sobre cómo deberían aplicarse los criterios de LD y LC a las toxinas de mayor toxicidad del grupo STX (REP 13/MAS, párrafo 22). Australia sugiere que, aunque el nivel máximo reglamentario se refiere a la toxicidad total hallada en la carne, en los criterios de rendimiento se considere sólo el analito que se examina, y no la toxicidad total. El Manual de Procedimiento permite que se elaboren criterios a partir de un método especificado (como lo ha hecho Noruega) y que se determinen los criterios correspondientes a los LD, LC y niveles de precisión y recuperación en forma separada para cada analito. Luego se determina la toxicidad total aplicando a cada análogo el FET pertinente y sumando el total.

El CCMAS también hace notar que existen dificultades para obtener materiales de referencia relativos a algunos análogos. Australia señala que cada país debe evaluar esta cuestión de acuerdo con el perfil de toxina que haya detectado en su programa de control. Más abajo se sugiere el añadido de una redacción para abordar este tema.

Camino a seguir

Opción 1

Australia también desea reconocer la labor realizada por Noruega y considera que la propuesta de este país contribuye en gran medida a una posible solución. Sin embargo, Australia hace notar que, en dicha propuesta, sigue pendiente la cuestión de la aplicación de la toxicidad total a un método de múltiples análogos. Por consiguiente, Australia opina que se podría arribar a una solución imitando el planteamiento de Noruega, pero eliminando por completo la medición de la toxicidad total de los criterios de rendimiento; en otras palabras, los criterios de rendimiento sólo deberían referirse al analito que se somete a examen, no a la toxicidad total. Australia señala que subsiste la necesidad de garantizar que los criterios de rendimiento puedan cumplir con la dosis máxima; sin embargo, una vez determinado esto último, no es necesario incluir los criterios de rendimiento relativos a la toxicidad total.

Por ende, Australia sugiere sustituir el Cuadro 1 del documento del proyecto de Criterios de Rendimiento con un cuadro similar al elaborado por Noruega, pero sin ninguna referencia a la toxicidad total (véanse las observaciones específicas más abajo).

Australia considera que las observaciones remitidas por Noruega han demostrado que los criterios de rendimiento enumerados para el nivel mínimo aceptable dan como resultado, efectivamente, un método que resulta apto para determinar la dosis máxima de toxicidad total; sin embargo, es necesario contar con más información para determinar si se logra el mismo objetivo con el Límite de Detección (LD) y el Límite de Cuantificación (LC). Específicamente, Australia recomienda que se proporcionen el LD, LC, y los valores de Precisión y de Recuperación para todos los análogos de la saxitoxina (STX).

Opción 2

Si no es posible alcanzar un acuerdo entre los países para hacer avanzar esta norma a través del método actual, podría ser necesario intentar resolver la cuestión de otra manera. Resulta claro que, al presente, la discusión versa sobre la medición de las PST; en particular, sobre los FET (campo que se encuentra en rápido avance y que la ciencia resolverá a su debido tiempo) y sobre el uso del bioensayo en ratones como análisis de confirmación (sobre el cual los países podrían nunca llegar a un acuerdo).

Ya que los métodos para los grupos del ácido ocaico, ácido domoico y azaspirácidos no son objeto de debate, el CCFFP debería considerar la posibilidad de enumerarlos como métodos de referencia y dejar el método para las PST como no resuelto hasta que la ciencia llegue a una conclusión sobre el tema y se cuente con FET plenamente validados.

Si se adopta este enfoque, sería necesario incluir en la norma sobre bivalvos un párrafo que se refiriese al uso de otros métodos como instrumentos reglamentarios adecuados en cualquier programa de gestión de biotoxinas. Por ejemplo: *"Además de los métodos enumerados, la autoridad competente podrá autorizar el uso de métodos adecuadamente validados, ya sean de detección o de confirmación, como instrumentos adecuados para la gestión de las biotoxinas"*.

Observaciones específicas

I-8.6 Determinación de biotoxinas

Los métodos de referencia Tipo II y III se elegirán con arreglo a los “Criterios generales para la selección de métodos de análisis” y los “Criterios generales para seleccionar métodos de análisis validados por un solo laboratorio”, ambos contenidos en el *Manual de Procedimiento del Codex*.

Los métodos seleccionados deberían elegirse en base a su practicabilidad y se debería dar preferencia a los métodos cuya aplicabilidad favoreciera la ejecución sistemática del método.

Los métodos deberán cumplir los criterios numéricos indicados en la Tabla 1 y se pueden necesitar los criterios de rango mínimo aplicable, o los criterios indicados en la lista para Límites de detección (LD) o Límites de cuantificación (LC).

~~Se establecen criterios para la toxicidad total de los métodos para múltiples análogos para los perfiles de toxinas detectadas utilizando datos validados de estudio.~~

Fundamento: esta información está incluida en el segundo párrafo que se encuentra debajo de la tabla.

I-8.6.2 Valores numéricos relativos a los criterios para las biotoxinas en los moluscos bivalvos

Cuadro 1

Grupo de toxinas	Toxina	Intervalo mínimo aplicable (mg/kg)	LD (mg/kg)	LC (mg/kg)	Precisión (RSD _R)	Porcentaje de recuperación
Grupo STX	Saxitoxina (STX)	0,05	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	(NEO)	0,05	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	(dcSTX)	0,05	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	GTX1	0,05	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	GTX2	0,10	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	GTX3	0,10	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	GTX4	0,05	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	GTX5	0,10	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	GTX6	0,10	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	dcGTX2	0,10	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	dcGTX3	0,10	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	C1	0,10	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	C2	0,10	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	C3	0,5	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
	C4	0,5	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>	<insertar valor>
Grupo OA	OA	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
	DTX1	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
	DTX2	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%

Ácido domoico	DA	13,9	1,4	2,8	<=20%	85-110%
Grupo AZA	AZA1	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
	AZA2	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%
	AZA3	0,05	0,01	0,02	<=44%	60-115%

La toxicidad total equivale a la suma de las concentraciones molares de análogos detectados multiplicadas por los factores de equivalencia tóxica (FET) específicos pertinentes. Se deberán utilizar los factores de equivalencia tóxica (FET) validados científicamente a nivel internacional ~~para calcular la toxicidad total de los métodos que no miden la toxicidad de manera directa.~~ **La investigación científica acerca de los FET avanza con rapidez. Los FET actualmente validados a nivel internacional pueden encontrarse en el sitio web de la FAO. Con posterioridad, se incluirá información sobre los FET en esta norma.**

Fundamento: el CCMAS ha solicitado que se incluya información sobre la manera de estimar la toxicidad total. El CCFFP sostuvo una amplia discusión sobre la cuestión de los FET y, pese a la recomendación del CCMAS, Australia considera que sobre este tema continuarán produciéndose rápidos cambios y que no se lo debería regular en esta norma. Véase la respuesta a las observaciones del CCMAS formuladas arriba.

Los métodos que no miden la toxicidad total de manera directa deberían validarse y utilizarse en el caso de análogos de toxinas que puedan contribuir a la toxicidad total. En el Cuadro 1 se indican los análogos de toxinas conocidos en la actualidad y que deben considerarse.

Cuando se detecten análogos de toxinas no enumerados en el Cuadro 1 en una concentración superior al 5% del contenido molar total de toxinas, la autoridad competente deberá evaluar la contribución de dichos análogos a la toxicidad total mediante los FET conocidos, o bien mediante una solución preventiva, asignando un FET provisorio mientras se realizan investigaciones ulteriores.

La autoridad competente deberá evaluar la cuestión de los materiales de referencia apropiados para todos los análogos que generen preocupación en los perfiles de toxinas locales.

Fundamento: dar respuesta a las observaciones del CCMAS y proporcionar orientaciones sobre los análogos de la saxitoxina no enumerados en el Cuadro 2 y sobre el uso de materiales de referencia adecuados. En Lawrence et al. (2011) se sugiere que deberían considerarse como insignificantes los análogos con una presencia inferior al 5% de la cantidad total de toxinas, mientras que deberían investigarse los compuestos que superen este valor.

REFERENCIAS

Munday, R and Reeve, J. *Risk assessment of shellfish toxins*. Toxins 2013. 5 p2109-2137

Munday, R Thomas, K Gibbs, R Murphy, C Quilliam, M. Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, decarbamoyl saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&# to mice by various routes of administration. Toxicon 2013, 76,77-83

Botana, L.M., et al. The problem of toxicity equivalent factors in developing alternative methods to animal bioassays for marine-toxin detection. Trends Analyt Chem 2010, 29(11): p. 1316-1325.

European Food Safety Authority, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on marine biotoxins in shellfish – saxitoxin group. 2009, EFSA: Parma, Italy. p. 76pp.

Weis, M D'Agostino, P Mihali, T Moffitt, M Neilan, B. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. Marine Drugs 2010, 8, 2185-2211

Lawrence, J Loreal, H Toyofuku, H Hess, P Iddya, K Ababouch, L. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 551, Assessment and Management of biotoxin risks in bivalve molluscs; Food and Agricultural Organisations of the United Nations: Rome, Italy, 2011

NORUEGA

En la 32ª reunión del CCFFP, se avanzó al CAC para su adopción en el trámite 5, y al CCMAS para su ratificación, un Anteproyecto de Criterios de Rendimiento para los Métodos de Referencia y Confirmación para Biotoxinas Marinas en la *Norma para los Moluscos Bivalvos Vivos y los Moluscos Bivalvos Crudos*.

En el 36º período de sesiones del CAC, se aprobó el proyecto en el trámite 5 y se lo avanzó al trámite 6, para someterlo a consideración del CCFFP durante su 33ª reunión. En la 34ª reunión del CCMAS, no se ratificaron los criterios del método para las biotoxinas y se alentó al CCFFP a proporcionar información sobre los factores de equivalencia tóxica de todas las biotoxinas enumeradas en la norma y sobre la aplicación de los criterios de LD y LC a las toxinas de mayor toxicidad del grupo de las saxitoxinas. Algunas delegaciones del CCMAS opinaron que los criterios expresados en el Manual de Procedimiento eran adecuados para los métodos químicos, pero que no resultaban aplicables a los métodos biológicos, tales como el bioensayo en ratones. Se dejó en claro que este último método se había propuesto para las biotoxinas como un método de Tipo I y que, por ende, no podían aplicársele los criterios. También se hizo notar que no es posible respaldar al mismo tiempo métodos de Tipo I y de Tipo II para la misma disposición. El CCMAS convino en que debería estudiarse la elaboración de criterios para la toxicidad total desde un punto de vista más general y en que considerará la elaboración de criterios aplicables a métodos de componentes múltiples para su próxima reunión, que tendrá lugar en 2014.

Los métodos analíticos para la determinación de biotoxinas están avanzando y se espera contar en el futuro con varios métodos químicos analíticos, que sustituirán a los ensayos biológicos. Tener criterios de rendimiento de métodos permitiría elegir con mayor flexibilidad el método que se aplicará. Los actuales criterios para la selección de métodos enumerados en el Codex se basan en métodos químicos para la determinación de componentes individuales y se describen en función de ellos. Asimismo, el Manual de Procedimiento describe la manera de convertir métodos recomendados en criterios.

En el caso de las biotoxinas, la toxicidad total se estima como la suma de las concentraciones de cada componente (análogos) de los grupos de toxinas, multiplicadas por los factores de equivalencia tóxica (FET) específicos. A fin de determinar la toxicidad total, cualquier método químico analítico adecuado debe ser capaz de determinar los análogos con un rendimiento satisfactorio. Dado que los requisitos de rendimiento para los análogos serían los mismos que para cualquier otro componente, bien podrían aplicarse los criterios de rendimiento de métodos que se explicitan en el Manual de Procedimiento. Las determinaciones de los análogos son independientes de los FET, ya que las concentraciones de los componentes se determinan por separado; por consiguiente, los métodos no pertenecen a la categoría del Tipo I.

Criterios de métodos y FET

En las Instrucciones de Trabajo para la Aplicación del Enfoque por Criterios en el Codex (Manual de Procedimiento, pág. 70) se establece que, en algunos casos, puede resultar más sencillo al Comité recomendar un método específico y "convertirlo" en los criterios apropiados. En este documento se propone convertir métodos específicos para el análisis de biotoxinas en criterios que sean aplicables a métodos. Los métodos que se recomiendan para su conversión en criterios son los métodos, validados entre laboratorios, de AOAC Internacional, el NMKL (Comité Nórdico sobre Análisis de los Alimentos), el Comité Europeo de Normalización y el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Biotoxinas Marinas. Los resultados de los estudios entre laboratorios de estos métodos se revisan, particularmente, en cuanto a los niveles mínimos validados que demuestran una precisión satisfactoria.

En general, los FET suponen un grado de incertidumbre mayor que el de las mediciones analíticas (para más información, véanse las referencias 1-4). Se reconoce que los FET son objeto de revisión a medida que surgen nuevos datos toxicológicos. Los valores de los FET para el grupo de las saxitoxinas se muestran en el Anexo I. A los fines de fijar criterios para métodos, y teniendo en cuenta la incertidumbre que implican los valores de los FET, se ofrecen los valores de los FET sugeridos a tal efecto en una columna separada, utilizando sólo un dígito significativo.

Es necesario que todos los métodos tengan la capacidad de detectar y determinar los análogos en un grupo particular de toxinas con un grado de sensibilidad que garantice la protección del consumidor. Por consiguiente, los FET deberían influir en el límite de cuantificación (LC) de los análogos de la toxina en el método. Por ejemplo, el método debería ser sensible a valores 10 veces menores en el caso de los análogos que sean aproximadamente 10 veces más tóxicos en comparación con otros. Esta cuestión está considerada en el Anexo 2. En dicho anexo se detallan también los niveles mínimos validados que demuestran una

precisión satisfactoria para los análogos de los grupos de toxinas, obtenidos en estudios de cada método específico realizados entre laboratorios. Los resultados de dichos estudios, así como los LC calculados a partir de los FET, constituyen la base de los criterios propuestos (Anexo 2). Tales criterios, junto con los métodos que los satisfacen, se detallan en el Cuadro 1 de este documento.

Se consigna la dosis máxima (DM) para la toxicidad total del grupo de toxinas en cuestión, que está integrado por varios análogos. Dado que el actual criterio de precisión para métodos establecido por el Codex se basa en la ecuación de Horwitz/Thompson, que es válida sólo para cada componente químico considerado en forma individual, tal criterio no se puede aplicar a métodos de componentes múltiples. Esta cuestión se explica brevemente en el Anexo 3: "Por qué la ecuación de Horwitz/Thompson no es válida para los métodos de componentes múltiples".

Los métodos en los que no se determinan los distintos componentes, por ejemplo, los bioensayos / pruebas en ratones, deberían validarse respecto de cualquiera de los métodos que cumplen con los criterios de rendimiento. Si se puede demostrar, mediante un estudio entre laboratorios (estudio de rendimiento de un método o programas de pruebas de capacidad) que el método en cuestión proporciona resultados equivalentes, se lo podría considerar apropiado.

Conclusiones

Noruega recomienda que el CCFFP, en su 33ª reunión, considere los siguientes temas:

- los factores de equivalencia tóxica (FET) volcados en el Anexo I (la propuesta de Noruega se encuentra en la última columna de la derecha, cuyo encabezado reza "Para los propósitos del Codex") para las PSP, así como los consignados en el Cuadro 1 de este documento para los grupos OA y AZP.
- los criterios aplicables a métodos que se sugieren en el Cuadro 1 de este documento sobre la base de las consideraciones expresadas en el Anexo 2. Recomendar valores numéricos para el rendimiento del método (LD, LC, intervalo mínimo aplicable (mAL) y precisión (RDS/HorRat)) relativos a los análogos de los grupos de toxinas en base a los FET. Notificar de que el actual criterio de precisión establecido por el Codex no es aplicable a la suma de las toxinas (de acuerdo con el Anexo 3).
- incluir y revisar otros métodos apropiados que satisfagan los criterios, y realizar nuevas comparaciones entre los resultados obtenidos por los bioensayos y los métodos químicos. Noruega solicita que los proveedores de programas de pruebas de capacidad (PT) envíen los resultados de los programas en los que se hayan utilizado diferentes métodos de análisis de biotoxinas. Si los resultados revisados son satisfactorios, podría tomarse una decisión en favor de los bioensayos en la reunión e incluirselos como un método apropiado sugerido.

Cuadro 1 Criterios de rendimiento de métodos para las biotoxinas en moluscos bivalvos

Producto	Disposición	Dosis máxima, DM	Criterios de rendimiento de métodos	Métodos adecuados
Moluscos bivalvos	<p>Toxicidad total del grupo de las saxitoxinas (STX)</p> <p>Véanse en el Anexo 1 los análogos y su FET</p>	0,8 mg/kg STX·diHCl eq	<p>Criterios basados en AOAC 2011.02 (Véase el Anexo 2 A)</p> <p>Para cada uno de los análogos con</p> <p>FET \geq 1 Intervalo mínimo aplicable \leq 0,05 mg/kg LD \leq 0,01 mg/kg LC \leq 0,02 mg/kg Precisión: RSD \leq 44%</p> <p>0,1 < FET < 1 Intervalo mínimo aplicable \leq 0,1 mg/kg LD \leq 0,03 mg/kg LC \leq 0,05 mg/kg Precisión: HorRat \leq 2 FET \leq 0,1 Intervalo mínimo aplicable \leq 0,5 mg/kg LD \leq 0,1 mg/kg LC \leq 0,2 mg/kg Precisión: HorRat \leq 2</p> <p>Recuperación: 50 - 130%</p>	<p>AOAC 2011.02 NMKL 197 (2013) HPLC– fluorescencia</p> <p>AOAC 2005.06 EN 14526:2004 NMKL 182 (2005) HPLC– fluorescencia</p> <p>AOAC 2011.27 Ensayo de unión a receptores - Prueba en ratones (comparado con AOAC 2005.06; véase el Anexo 4)</p> <p>[AOAC 959.08 Bioensayo en ratones - Véase en el Anexo 4 su comparación con AOAC 2005.06 - ¿Se necesitan más datos?</p>
Moluscos bivalvos	<p>Toxicidad total del grupo del ácido ocaídoico (OA)</p> <p>FET del grupo OA: OA: 1,0 DTX1: 1,0 DTX2: 0,5</p>	0,16 mg/kg OA eq	<p>Basado en el POE¹ de la UE (Véase el Anexo 2B)</p> <p>Para cada uno de los análogos con</p> <p>FET \geq 1 mAL \leq 0,04 mg/kg LD \leq 0,01 mg/kg LC \leq 0,03 mg/kg Precisión: RSD \leq 44%</p> <p>FET \leq 0,5 mAL \leq 0,1 mg/kg LD \leq 0,03 mg/kg LC \leq 0,05 mg/kg Precisión: HorRat \leq 2 Recuperación: 60 -115%</p>	<p>"Procedimiento Operativo Estándar de la Unión Europea para la determinación de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos por LC-MS/MS"¹</p> <p>Procedimiento Operativo Estándar de la Unión Europea para la determinación de toxinas del grupo OA por LC-MS/MS²</p> <p>EN 16204:2012 LC-MS/MS</p>
Moluscos bivalvos	Ácido domoico	20 mg/kg	<p>Del Manual de Procedimiento Intervalo mínimo aplicable: 14 mg/kg LD: 2 mg/kg LC: 4 mg/kg Precisión: HorRat \leq 2 Recuperación: 85-110% (en base a la validación del método)</p>	<p>EN 14176:2003 HPLC</p> <p>Procedimiento operativo estándar EURLMB para la determinación del ácido domoico³ (toxinas ASP en moluscos por</p>

Producto	Disposición	Dosis máxima, DM	Criterios de rendimiento de métodos	Métodos adecuados
				UPLC-MS) POE armonizado de la UE; HPLC UV ⁴ AOAC 2006.02 ELISA [AOAC 991.26 HPLC 20 mg/kg]
Moluscos bivalvos	Grupo de los azaspirácidos (AZP) FET del grupo AZP: AZA-1: 1,0 AZA-2: 1,8 AZA-3: 1,4	0,16 mg/kg AZA eq	Basado en el POE de la UE ¹ (véase el Anexo 2B) Para cada uno de los análogos con FET ≥ 1 Intervalo mínimo aplicable $\leq 0,03$ mg/kg LD $\leq 0,01$ mg/kg LC $\leq 0,02$ mg/kg Precisión: RSD $\leq 44\%$ Recuperación: 40 -120%	Estudio de validación del "Procedimiento Operativo Estándar de la Unión Europea para la determinación de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos por LC-MS/MS" ¹ EN 16204:2012 LC-MS/MS

- 1) Enlace al estudio de validación entre laboratorios del "Procedimiento Operativo Estándar de la Unión Europea para la determinación de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos por LC-MS/MS"
http://www.aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/ayuda_cientifica/report_inter.pdf
- 2) Se puede acceder a este método mediante el siguiente enlace:
<http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/procedimientos/EU-Harmonised-SOP-LCMS-OA-Version1.pdf>
- 3) Se puede acceder a este método mediante el siguiente enlace:
http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EURLMB_SOP_Domoic_acid_UPLC-MS.pdf
- 4) Se puede acceder a este método mediante el siguiente enlace:
http://www.aesan.msps.es/CRLMB/docs/docs/procedimientos/EU-Harmonised-SOP-ASP-HPLC-UV_Version1.pdf

Referencias:

1. Aune, T.; Larsen, S.; Aasen, J. A. B.; Rehmann, N.; Satake, M.; Hess, P., Relative toxicity of dinophysistoxin-2 (DTX-2) compared with okadaic acid, based on acute intraperitoneal toxicity in mice *Toxicon* 2007, 49, 1–7.
2. Huhn, J.; Jeffrey, P. D.; Larsen, K.; Rundberget, T.; Rise, F.; Cox, N. R.; Arcus, V.; Shi, Y.; Miles, C. O., A structural basis for the reduced toxicity of dinophysistoxin-2. *Chem. Res. Toxicol.* 2009, 22, 1782,1786.
3. Garibo, D.; de la Iglesia, P.; Diogène, J.; Campàs, M., Inhibition equivalency factors for dinophysistoxin-1 and dinophysistoxin-2 in protein phosphatase assays: applicability to the analysis of shellfish samples and comparison with LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 2572,2579.
4. McCarron, P.; Kilcoyne, J.; Miles, C. O.; Hess, P., Formation of azaspiracids-3, -4, -6, and -9 via decarboxylation of carboxyazaspiracid metabolites from shellfish. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 160–169.

Anexo 1 Factores de equivalencia tóxica (FET) para las toxinas PSP*Cuadro A1 FET para las toxinas PSP*

TOXINA PSP	FET Oshima 2004	FET EFSA 2009	FET basado en MBA Munday <i>et al.</i> 2013	Dosis letal 50 por inyección ip Munday <i>et al.</i> 2013	Dosis letal 50 oral Munday <i>et al.</i> 2013	Para los propósitos del Codex
STX	1,000	1,0	1,00	1,00	1,00	1
GTX1	0,994	1,0	--	--	--	1
GTX2	0,359	0,4	--	--	--	0,4
GTX3	0,638	0,6	--	--	--	0,6
GTX4	0,726	0,7	--	--	--	0,7
GTX1,4 (80, 20%)	--	--	1,02	1,90	0,93	1*
GTX2,3 (68, 31%)	--	--	0,60	0,76	0,57	0,6*
GTX5 (B1)	0,064	0,1	--	--	--	0,1
GTX6 (B2)	0,064	0,1	--	--	--	0,1
dcGTX2	0,154	0,2	--	--	--	0,2
dcGTX3	0,377	0,4	--	--	--	0,4
C1 (epi-GTX8)	0,006	--	--	--	--	0,006
C2 (GTX 8)	0,096	0,1	--	--	--	0,1
C3	0,013	--	--	--	--	0,01
C4	0,058	0,1	--	--	--	0,1
NEO	0,924	1,0	1,16	3,12	2,54	1
dcSTX	0,513	1,0	0,64	0,79	0,37	0,6
dcNEO (GTX 7)	--	0,4	--	--	--	0,4
11-hidroxisaxitoxina	0,319	0,3	--	--	--	0,3
<i>B. Ben-Gigirey et al. (publicación en prensa 2014)</i> (recibido de la Dra. Ana Gago-Martínez, del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Biotoxinas Marinas)						suma
						7*

* No se computan en la suma los FET de GTX1,4 y GTX3,4, al estar incluidos los distintos FET de GTX1, GTX2, GTX3 y GTX4.

Anexo 2: Criterios basados en la conversión de métodos y el cálculo de los LC en base a los FET

A) Criterios para las toxinas paralizantes de los moluscos, PSP

Se han establecido estos criterios en base a los resultados de los siguientes métodos:

- AOAC 2011.02 / NMKL 197: Toxinas paralizantes de los moluscos en mejillones, almejas, ostras y pectínidos. Método de oxidación post-columna (PCOX)

Sobre la base de los estudios entre laboratorios, en la Tabla A2.1 se consignan, para cada análogo, los niveles mínimos validados que demuestran una precisión satisfactoria según la ecuación de Horwitz /Thompson.

Se ha sugerido basar los criterios sobre el límite de cuantificación, LC, para cada análogo de toxina, tomando en cuenta el FET. Cuando un análogo es 10 veces más tóxico que otro, el LC debería ser aproximadamente 10 veces menor. Además, el hecho de que un grupo de toxinas contenga varios análogos también debería afectar el LC (por ejemplo, si hubiera 10 análogos con FET=1, el LC debería verse afectado por un factor de 1/10 a la dosis máxima, DM, para garantizar la inocuidad del alimento.)

En el Codex, los criterios para métodos en cuanto al LC son $1/5 \cdot DM$ en el caso de los niveles superiores a 0,1 mg/kg, y $2/5 \cdot DM$ para los inferiores a 0,1 mg/kg. Por lo tanto, matemáticamente, el LC necesario para un análogo X en un grupo Y de toxinas podría expresarse con relación al análogo de origen Z (aquel cuyo FET=1).

$$LOQ(Z) = \frac{ML \cdot \frac{1}{5} \cdot 1}{\sum TEF(Y)} \quad (1)$$

$$LOQ(X) = \frac{LOQ(Z)}{TEF(X)} \quad (2)$$

Para los análogos de la toxina PSP, de acuerdo con los "FET recomendados por el Codex", la suma de los FET, $\sum FET(Y)$ sería 7 eq. (que figura en el Anexo A) y la DM = 0,8 mg/kg eq. A partir de las ecuaciones 1 y 2, con estos valores se obtienen los siguientes resultados:

$$LC(Z) = 0,8 \text{ mg/kg eq} \cdot 1/5 \cdot 1 \text{ eq} / 7 \text{ eq} = 0,02 \text{ mg/kg eq}$$

Si FET = 1, el LC sería: $0,02 \text{ mg/kg eq} / 1 \text{ eq} = 0,02 \text{ mg/kg}$

De acuerdo con los criterios del Codex, el límite de detección, LD, es $1/2$ del LC. Los valores numéricos para el intervalo mínimo aplicable, mAL, correspondientes a cada análogo pueden obtenerse fácilmente utilizando los criterios del Codex, a los que se puede acceder en la página web del NKML, www.nmkl.org, bajo "Descarga de hoja de cálculo de Excel", "Cómo obtener criterios de método basados en la DM" ("Excel Spreadsheet for downloading", "How to get method criteria based on ML"). (N. del T.: la página web mencionada sólo está en noruego e inglés.)

La tabla que figura abajo muestra los resultados del estudio entre laboratorios, los criterios basados en los LC calculados a partir de los valores de los FET y, por último, los criterios propuestos en base a la combinación de unos y otros. Allí se aprecia que los resultados obtenidos en los estudios entre laboratorios son satisfactorios y que el método permite determinar niveles mínimos para todos los análogos. Dado que los análogos con FET muy bajos contribuyen menos a la toxicidad total que los análogos cuyo FET es cercano a 1, no es necesario que los niveles mínimos validados que demuestran precisión satisfactoria sean tan bajos como los obtenidos en la validación del método. Por consiguiente, también se ha tenido en cuenta como criterio el cálculo del LC. Por otro lado, los criterios basados en el cálculo del LC podrían resultar demasiado imprecisos, ya que la suma de los mAL derivados de los cálculos de LC, multiplicados por los respectivos FET, podría exceder la DM. Por lo tanto, se ha tomado en cuenta una combinación, por una parte, de la conversión del método en criterios y por la otra, de criterios basados en cálculos del LC. En lo que concierne a la recuperación, las validaciones han mostrado que los criterios que figuran en el Manual de Procedimiento del Codex resultan demasiado estrictos para estos analitos y matrices, y se ha validado la recuperación a niveles del 50-130%.

Tabla A2.1 Los análogos del grupo de las saxitoxinas, el nivel mínimo validado que demuestra una precisión satisfactoria obtenido en el estudio de AOAC 2011.02/NMKL 197 realizado entre laboratorios, los FET, los criterios calculados en base a los FET y los criterios propuestos a partir de los resultados del estudio y los criterios calculados en base a los FET.

Análogos	Nivel mínimo validado (mg/kg)	FET	Criterios calculados en base a los FET* (mg/kg)			Criterios propuestos a partir de los resultados de la validación del método y los criterios calculados en base a los FET
			LD	LC	mAL	
STX	0,04	1	0,01	0,02	0,03	FET \geq 1 mAL \leq 0,05 mg/kg LD \leq 0,01 mg/kg LC \leq 0,02 mg/kg Precisión: RSD \leq 44%
NEO		1	0,01	0,02	0,03	
GTX 1	0,07	1	0,01	0,02	0,03	
GTX 4	0,06	0,7	0,02	0,03	0,05	0,1 < FET < 1 mAL \leq 0,1 mg/kg LD \leq 0,03 mg/kg LC \leq 0,05 mg/kg Precisión: HorRat \leq 2
dcSTX	0,04	0,6	0,02	0,04	0,08	
GTX 2	0,14	0,4	0,03	0,06	0,1	
GTX 3	0,06	0,6	0,02	0,04	0,08	
dcGTX3	0,04	0,4	0,03	0,06	0,1	
dcGTX2	0,14	0,2	0,06	0,11	0,3	
GTX 5 (B-1)	0,14	0,1	0,11	0,23	0,5	FET \leq 0,1 mAL \leq 0,5 mg/kg LD \leq 0,1 mg/kg LC \leq 0,2 mg/kg Precisión: HorRat \leq 2
C-1	0,05	0,006	1,90	3,81	13	
C-2	0,05	0,1	0,11	0,23	0,5	
C-3	-	0,01	1,14	2,29	7,3	
C-4	-	0,1	0,11	0,23	0,5	

* LC(Z)=0,8 mg/kg: 1/5·1/7 (0,8 es la DM, 1/5 se debe a niveles superiores a 0,1 mg/kg, 7 es el resultado de la suma de FET (Anexo 1)). LC(X) = LC(Z)/FET(X), LD y mAL están en la hoja de cálculo Excel del NKML basada en los criterios del Codex, correspondientes a DM de 0,1, de 0,15, de 0,2, de 0,3, de 0,55, de 1, de 11 y de 19 mg/kg, respectivamente.

B) Criterios para las toxinas lipofílicas

Se han utilizado resultados obtenidos con el siguiente método:

- EU-RL-MB: Estudio de validación entre laboratorios del Procedimiento Operativo Estándar de la Unión Europea para la determinación de biotoxinas marinas lipofílicas en moluscos por LC-MS/MS.

El método se ha validado para las toxinas del grupo OA y del grupo AZA, entre otras. La tabla A2.2 muestra los resultados del estudio de validación, los criterios obtenidos al calcular los LC en base a los FET y, por último, los criterios propuestos a partir de la combinación de unos y otros.

Tabla A2.2 Los análogos de grupos de toxinas, el nivel mínimo validado que demuestra una precisión satisfactoria obtenido en los estudios de EURLM realizados entre laboratorios, los FET, los criterios calculados en base a los FET y los criterios propuestos a partir de los resultados del estudio y los criterios calculados en base a los FET.

Análogos OA	Nivel mínimo validado (mg/kg)	FET	Criterios calculados en base a los FET* (mg/kg)	Criterios propuestos a partir de los resultados de la validación del método y los criterios calculados en base a los FET
Ácido ocaidaico, OA	0,06	1	Por cálculo según ecuaciones 1 y 2:	FET \geq 1 mAL \leq 0,04 mg/kg LD \leq 0,01 mg/kg LC \leq 0,03 mg/kg Precisión: RSD \leq 44%
Dinofisistoxina-1 (DTX1)	0,1	1	FET = 1: LC = 0,03 mg/kg	
Dinofisistoxina-2 (DTX2)	0,04	0,5	LD = 0,01 mg/kg mAL = 0,04 mg/kg	

	Σ FET	2,5	FET = 0,5: LC = 0,05 mg/kg LD = 0,03 mg/kg mAL = 0,1 mg/kg En el POE ² (referencia bajo la tabla 1), los criterios para mAL = 0,04 mg/kg	FET \leq 0,5 mAL \leq 0,1 mg/kg LD \leq 0,03 mg/kg LC \leq 0,05 mg/kg Precisión: HorRat \leq 2
Análogos AZA				
AZA 1	0,04	1	Por cálculo según ecuaciones 1 y 2: FET = 1: LC = 0,02 mg/kg LD = 0,01 mg/kg mAL = 0,03 mg/kg FET = 1,8: LC = 0,01 mg/kg LD = 0,006 mg/kg mAL = 0,02 mg/kg	FET \geq 1 mAL \leq 0,03 mg/kg LD \leq 0,01 mg/kg LC \leq 0,02 mg/kg Precisión: RSD \leq 44%
AZA 2	0,02	1,8		
AZA 3	0,02	1,4		
	Σ FET	4,2		

* LC(Z)=0,8 mg/kg·1/5·1/7 (0,8 es la DM, 2/5 se debe a niveles inferiores a 0,1 mg/kg, 7 es el resultado de la suma de FET (Anexo 1)). LC(X)=LC(Z)/FET(X), LD y mAL están en la en la hoja de cálculo de Excel del NKML basada en los criterios del Codex.

Anexo 3: Por qué la ecuación de Horwitz/Thompson no es válida para los métodos de componentes múltiples

La toxicidad total consiste en la suma de la concentración de cada análogo multiplicada por el FET respectivo.

En el intervalo mínimo aplicable, mAL, este valor se expresa como Σ mAL·FET.

En el Manual de Procedimiento del Codex, se establece que el criterio de precisión es la desviación estándar relativa o RSD, que se expresa de la siguiente manera:

$$RSD(\%) = \frac{s}{x} \cdot 100\% \Leftrightarrow s = \frac{RSD \cdot x}{100} \quad (1)$$

donde s es la desviación estándar y x es la concentración (aquí: $x = \text{mAL} \cdot \text{FET}$).

La desviación estándar para la toxicidad total sería la incertidumbre combinada de la desviación estándar de los análogos, es decir, la suma de las varianzas de la desviación estándar, s^2 , de los análogos en cuestión.

$$s_{total} = \sqrt{\sum s_i^2} = \sqrt{\left(\frac{RSD_i}{100} \cdot \text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i\right)^2} \quad (2)$$

La desviación estándar relativa de la toxicidad total, RSD_{total} , en el intervalo mínimo aplicable (mAL), es la raíz cuadrada de la suma de las varianzas de cada uno de los componentes, dividida por la concentración:

$$RSD_{total}(\%) = \frac{\sqrt{\sum \left(\frac{RSD_{Ri}}{100} \cdot \text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i\right)^2}}{\sum (\text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i)} \cdot 100\% = \frac{\sqrt{\sum (RSD_{Ri} \cdot \text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i)^2}}{\sum (\text{mAL}_i \cdot \text{TEF}_i)} \quad (3)$$

Según los valores de FET, los mAL para PSP son 0,05, 0,1 y 0,5 mg/kg respectivamente (véase el Anexo 2) (correspondientes a las dosis máximas de 0,14, de 0,25 y de 1 mg/kg en los criterios del Codex, de acuerdo con la hoja de cálculo de Excel que se encuentra en la página de inicio del NKML). Para estos niveles, la RSD variará entre 32-44%. Los números utilizados en los cálculos figuran en la siguiente tabla:

Tabla 3.1 FET, mAL y RSD de las toxinas PSP y la combinación de estos valores para la estimación de la desviación estándar relativa de la toxicidad total, RSD_{total}

TOXINA PSP	FET	mAL (mg/kg)	FET· mAL (mg/kg eq.)	RSD(%)	$(mAL \cdot FET \cdot RSD)^2$ (mg/kg eq %) ²
STX	1	0,05	0,05	44	4,84
GTX1	1	0,05	0,05	44	4,84
GTX2	0,4	0,1	0,04	39	2,43
GTX3	0,6	0,1	0,06	39	5,48
GTX4	0,7	0,1	0,07	39	7,45
GTX5 (B1)	0,1	0,5	0,05	32	2,56
GTX6 (B2)	0,1	0,5	0,05	32	2,56
dcGTX2	0,2	0,1	0,02	39	0,608
dcGTX3	0,4	0,1	0,04	39	2,43
C1 (epi-GTX8)	0,006	0,5	0,003	32	0,0092
C2 (GTX 8)	0,1	0,5	0,05	32	2,56
C3	0,01	0,5	0,005	32	0,026
C4	0,1	0,5	0,05	32	2,56
NEO	1	0,05	0,05	44	4,84
dcSTX	0,6	0,1	0,06	39	5,48
dcNEO (GTX 7)	0,4	0,1	0,04	39	2,43
11-hidroxisaxitoxina	0,3	0,1	0,03	39	1,37
Suma	7		0,718		52,48

Utilizando la fórmula (3) para estimar la desviación estándar relativa de la toxicidad total, se obtiene lo siguiente:

$$RSD_{total}(\%) = \frac{\sqrt{4.84+4.84+2.43+\dots+1.37}}{0.72} = 10\%$$

Una desviación estándar relativa del 10% para la toxicidad total es muy ajustada. Si estuvieran presentes sólo los cinco primeros análogos de las toxinas PSP de la tabla 3.1 (STX, GTX1, GTX2, GTX3 y GTX4), el valor de la RSD_{total} sería del 19%. Si estuviera presente sólo la STX, el valor de la RSD_{total} sería del 44%. Y cuando hubiera sólo un análogo, el resultado dependería del valor numérico obtenido mediante la ecuación de Horwitz/Thompson.

La DM para la toxicidad total de PSP es 0,8 mg/kg STX·diHCl eq. Para un solo componente con una concentración de 0,8 mg/kg, la RSD_R prevista es 33%. Si este fuera el requisito de toxicidad total, y estuvieran presentes todos los análogos, la RSD de cada análogo podría ser superior al 100%, lo cual no resulta satisfactorio.

La RSD del total disminuye al incrementarse la cantidad de componentes. A más componentes, menor es la RSD. Esta proposición puede ejemplificarse fácilmente si suponemos que, para n análogos, FET=1, mAL=1 y RSD=44%.

$$RSD_{total} = \frac{\sqrt{\sum (RSD_{Ri} \cdot mAL_i \cdot TEF_i)^2}}{\sum (mAL_i \cdot TEF_i)} = \frac{\sqrt{\sum (44_1 \cdot 1_1 \cdot 1_1)^2 + (44_2 \cdot 1_2 \cdot 1_2)^2 + \dots + (44_n \cdot 1_n \cdot 1_n)^2}}{\sum (1_1 \cdot 1_1) + \dots + (1_n \cdot 1_n)}$$

$$= \frac{\sqrt{44^2 \cdot n}}{n} = \frac{44\sqrt{n}}{n}$$

Cuando se incrementa el valor de n , disminuye el de la RSD_{total} .

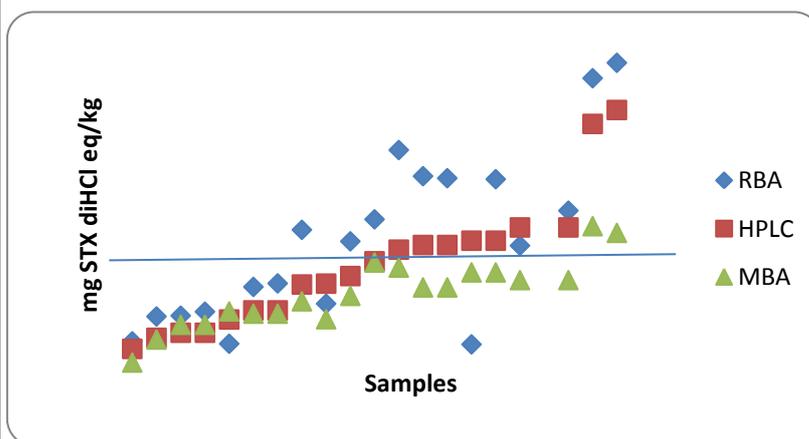
De esta manera, queda demostrado que la ecuación de Horwitz/Thompson no puede aplicarse a resultados de componentes múltiples, ni tiene sentido fijar criterios para la precisión de una suma de componentes, en base a la ecuación expuesta arriba, ya que la precisión será menor a pesar de que haya más análogos presentes.

Anexo 4 Comparación de métodos para toxinas paralizantes de los moluscos

Fuente: Van Dolah, Frances M.; Fire, Spencer E.; Leighfield, Tod A.; Mikulski, Christina M.; Doucette, Gregory J.. Determination of Paralytic Shellfish Toxins in Shellfish by Receptor Binding Assay: Collaborative Study, *J. AOAC Int.* 95, 795 (2012)

Durante la validación de AOAC 2011.27, se comparó un ensayo de fijación a receptores (RBA) para toxinas paralizantes de los moluscos (PSP), con formato de microplacas, con el método HPLC (AOAC 2005.06) y con el bioensayo en ratones (AOAC 959.08). Se analizaron un total de 21 homogenados de moluscos. Nueve laboratorios realizaron los análisis según AOAC 2011.27 y uno de ellos analizó las muestras utilizando el método HPLC de oxidación pre-columna (AOAC 2005.06) a fin de determinar la composición de congéneres de la STX. Tres laboratorios llevaron a cabo el bioensayo en ratones (AOAC 959.08). El estudio se propuso determinar la capacidad del ensayo de medir la toxicidad de PST de las muestras por debajo, cerca o levemente por encima del límite reglamentario. Los resultados aparecen en la tabla y en la figura que se incluyen abajo, donde se ve el incremento del contenido que arroja el método HPLC. Las cifras en negrita son los resultados obtenidos al valor de la dosis máxima y por encima de ella. Puede apreciarse que, a niveles cercanos y superiores a la dosis máxima de 0,8 mg/kg STX diHCl eq, el método MBA arroja resultados inferiores a los de los métodos HPLC y RBA.

Muestra	RBA	HPLC	MBA
AOAC	2011,27	2005,06	959,08
1	0,168	0,108	-
2	0,365	0,196	0,182
3	0,371	0,236	0,299
4	0,403	0,236	0,299
5	0,149	0,341	0,405
6	0,599	0,413	0,387
7	0,627	0,413	0,387
8	1,051	0,618	0,485
9	0,466	0,625	0,343
10	0,96	0,685	0,528
11	1,134	0,802	0,792
12	1,683	0,894	0,752
13	1,476	0,931	0,595
14	1,46	0,931	0,595
15	0,144	0,965	0,714
16	1,452	0,965	0,714
17	0,926	1,07	0,653
19	1,203	1,07	0,653
20	2,252	1,89	1,08
21	2,374	2	1,027



NUEVA ZELANDIA

Nueva Zelanda toma nota de las deliberaciones del CCMAS respecto de los criterios aplicables a métodos de ensayo para las biotoxinas marinas y formula las siguientes observaciones.

La razón por la que originalmente se adoptó el enfoque del planteamiento de criterios fue la falta de consenso dentro del CCFFP en cuanto al método de referencia apropiado para cada grupo de toxinas.

Contar con métodos de referencia continúa siendo una situación ideal. Parecería que la mayor parte de los países utilizan métodos HPLC para la detección del ácido domoico (en Nueva Zelanda, LC-MS, que guarda una adecuada correlación con el método HPLC). Actualmente, muchos países utilizan el método LC-MS para los grupos del ácido ocadaico y de los azaspirácidos, en lugar de los bioensayos en ratones para las toxinas lipofílicas utilizados en el pasado, ya que estos últimos dan lugar a una gran cantidad de falsos positivos y a algunos falsos negativos.

Se informa desde Estados Unidos de la presencia de brevetoxinas, que en el pasado constituyeron un problema en Nueva Zelanda y que no se han detectado en cantidades significativas en los últimos 20 años. No tenemos conocimiento de que se realicen ensayos para determinar su presencia en productos que circulan en el comercio internacional.

El principal tema de debate pendiente es el uso de bioensayos en ratones para la detección del grupo de las saxitoxinas, cuyo uso, en varios países, se está dejando de lado progresivamente en favor de métodos químicos y funcionales. Los métodos químicos que se utilizan actualmente descansan, en gran medida, en estudios de la toxicidad de diferentes análogos de toxinas por medio del bioensayo en ratones con inyección intraperitoneal, a fin de establecer factores de equivalencia tóxica (FET). Sin embargo, se están realizando estudios de toxicidad oral para estos congéneres de toxinas en más de un país, incluida Nueva Zelanda, y los resultados muestran discrepancias significativas entre la toxicidad oral y la intraperitoneal; ciertos análogos presentan una toxicidad oral significativamente mayor en algunos casos, pero menor en otros.

Además, a partir de información de casos de intoxicación por moluscos en la situación de Nueva Zelanda, resulta evidente que, cuando están presentes en los moluscos la saxitoxina y la neosaxitoxina, es probable que no haya un margen de inocuidad suficiente entre el valor actual de 0,8 mg/kg y el nivel al que los consumidores se enferman, en relación con los márgenes de inocuidad aplicados a otros contaminantes de los alimentos. No tenemos conocimiento de que otros análogos de toxinas que existen en nuestra aguas (fundamentalmente, toxinas C) hayan producido enfermedades, ni siquiera en concentraciones de 20-30mg/kg en los moluscos consumidos.

Nueva Zelanda propone que, en vista de lo que antecede, y a fin de avanzar con la sección de métodos para biotoxinas en la Norma para Moluscos Bivalvos, el Comité debería examinar la siguiente opción:

- Establecer métodos de referencia para el ácido domoico y sus isómeros, el grupo del ácido ocadaico y los azaspirácidos.
- Eliminar los límites y métodos de ensayo para las brevetoxinas, ya que éstas no son objeto de ningún ensayo en productos que circulan en el comercio internacional.
- Insertar la leyenda "Por elaborar" en relación con el método de referencia para el grupo de las saxitoxinas, a la espera de nuevos avances científicos que permitan establecer factores de equivalencia tóxica orales adecuados. Debería incluirse una nota al pie a tal efecto, en la que se hiciera notar que actualmente se utilizan en el mundo diversos métodos que ofrecen un nivel de protección razonable.

Adjuntamos un ejemplar de un artículo reciente de Nueva Zelanda en el que se explica por qué resultan inadecuados los estudios toxicológicos intraperitoneales y, por ende, los métodos de ensayo basados en ellos. Remitimos este artículo en el marco de nuestras observaciones y solicitamos que el Comité tenga en cuenta esta información en sus deliberaciones sobre este tema.

Nueva Zelanda opina que el concepto de "toxicidad total" basado en el bioensayo en ratones intraperitoneal es erróneo y crea un doble problema. El primero consiste en la sobreestimación del riesgo de algunos análogos de toxinas; el segundo es la subestimación del riesgo que acarrearán otros. El uso continuado del bioensayo en ratones impide que se establezcan límites con los márgenes de inocuidad correctos que sí se fijarían para otros contaminantes. El mismo problema ha ocurrido con las toxinas lipofílicas, algo que se ha

resuelto, en gran medida, por medio de la realización de ensayos focalizados en compuestos específicos. Es necesario abordar de la misma manera el grupo de compuestos de las saxitoxinas.

Los criterios consensuados en la reunión del CCFFP de 2012 fueron el fruto de muchas soluciones de avenencia por parte de varias delegaciones a fin de alcanzar un resultado. Un elemento clave de dichas soluciones fue la decisión de no incluir los FET, ante la falta de consenso. Si ha de continuarse con el enfoque basado en criterios, Nueva Zelandia no puede sino estar de acuerdo en que se incluyan los FET derivados de estudios de toxicidad oral. Nueva Zelandia no apoya la idea de que se incluyan los FET que resulten de estudios intraperitoneales.

Métodos de detección y de referencia

Existe un segundo debate, aún no resuelto, que versa sobre la relación entre los métodos de detección y métodos de referencia validados; algunos países insisten en que se utilicen métodos de referencia para los ensayos sobre productos que son objeto de intercambio comercial. Otros opinan que deberían bastar otros métodos de detección o de confirmación, siempre y cuando se encuentren validados de tal manera que ofrezcan la garantía de que los productos que sean aptos según estos métodos de detección siempre lo sean según el método de referencia pertinente.

Nueva Zelandia sostiene firmemente que no debería importarse qué método se utilice para examinar un producto siempre que, sometido a un método de referencia, éste exhiba límites aceptables. Si se pudiera convenir en agregar una redacción a tal efecto en la Norma para Moluscos Bivalvos, se contribuiría a resolver la dificultad que experimentan los países con los métodos de referencia que actualmente no pueden implementar en razón de su costo o complejidad técnica.