



**PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS**

**COMITÉ DEL CODEX SOBRE RESIDUOS DE  
MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN LOS ALIMENTOS**

**Vigésima reunión**

*San Juan, Puerto Rico, del 7 al 11 de mayo de 2012*

**ANTEPROYECTO DE DIRECTRICES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES PARA  
EL ANÁLISIS DE RESIDUOS MÚLTIPLES (APÉNDICE PARA LA CAC/GL 71-2009)**

**(N01-2011)**

en el Trámite 3

(Informe del Grupo de Trabajo electrónico (GTe) del CCRVDF sobre métodos de análisis para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, presidido por Canadá y el Reino Unido, con la colaboración de Australia, Brasil, Costa Rica, la Unión Europea, Francia, Alemania, Los Países Bajos, Nueva Zelandia, Suecia, Suiza, el Reino Unido, Estados Unidos de América, Uruguay, OIEA, IDF y el IFAH).

Se invita a los gobiernos y a los organismos internacionales interesados que deseen formular observaciones en el Trámite 3 en relación con el Anteproyecto de Directrices sobre las características funcionales para el análisis de residuos múltiples (consulte el Anexo 1), enviarlas **a más tardar para el 31 de marzo de 2012** como sigue: U.S. Codex Office, Food safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, Room 4861, South Building, 14<sup>th</sup> Independence Avenue, S.W., Washington DC 20250, USA (por fax: +1 202 720 3157; o *de preferencia* por correo electrónico: [CCRVDF-USSEC@fsis.usda.gov](mailto:CCRVDF-USSEC@fsis.usda.gov), con una copia al Secretario de la Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy (por fax: +39.060.57050.4593; o *de preferencia* por correo electrónico [Codex@fao.org](mailto:Codex@fao.org)).

**Formato para presentar comentarios:** Para facilitar la recopilación de los comentarios y preparar un documento útil con todos ellos, se solicita que los Miembros y Observadores, que aún no lo están haciendo, envíen sus comentarios en el formato indicado en el Anexo 2 de este documento.

**Introducción**

1. Durante la 19ª reunión del Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CCRVDF) se discutieron los problemas de los métodos de análisis para los residuos de medicamentos veterinarios y la extensión de las directrices actuales respecto a los criterios de rendimiento para métodos de un solo analito (o compuesto) en la directriz CAC/GL 71-2009, para incluir métodos de análisis de residuos múltiples.

2. Para este fin y para abordar la cuestión sobre la disponibilidad de métodos, el Comité acordó establecer un GTe presidido por Canadá y el Reino Unido, que trabajaría solo en inglés, y que estaría abierto a todos los miembros del Codex y organizaciones en calidad de observadores, y que tendrían el siguiente mandato:

- Preparar un anteproyecto de Apéndice sobre los criterios funcionales de los métodos de análisis de residuos múltiples para residuos de medicamentos veterinarios, para su inclusión en las *Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos* (CAC/GL 71-2009); y

- Examinar oportunidades para facilitar la comunicación con el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) acerca de la elaboración de la base de datos sobre métodos de análisis y patrones de referencia.

### **Avances**

3. El GTe redactó el borrador del apéndice sobre los criterios funcionales de los métodos de análisis de residuos múltiples y lo revisó en tres distintas ocasiones. Además de los comentarios recibidos por parte del grupo a cargo de su redacción, se realizaron varias presentaciones sobre el tema en un gran número de reuniones científicas internacionales, los puntos de vista recabados durante éstas, también ayudaron a preparar este anteproyecto de apéndice. El documento actual se anexa para ser considerado por el Comité.

4. Se han llevado a cabo debates con el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y en este momento se está evaluando una base de datos que albergará una colección de los métodos de análisis de residuos múltiples. Durante la 20ª reunión del Comité se presentará una actualización respecto a los avances logrados hasta ese momento.

### **Recomendaciones**

- i. Revisar el anteproyecto de apéndice sobre los criterios funcionales de los métodos de análisis de residuos múltiples (consulte el Anexo 1), así como proporcionar comentarios del anteproyecto actual, remitiéndolo al siguiente trámite si así se considerara apropiado.
- ii. Considerar el avance (a ser actualizado durante la 20ª sesión) del desarrollo de la base de datos de los métodos de análisis de residuos múltiples por parte del OIEA, además de solicitar aportes a los países miembros y terceros interesados, para la base de datos de métodos de análisis de residuos múltiples.

**ANTEPROYECTO DE DIRECTRICES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES PARA  
EL ANÁLISIS DE RESIDUOS MÚLTIPLES**

**(APÉNDICE PARA LA CAC/GL 71-2009)**

**(N01-2011)**

**en el Trámite 3**

**CONTENIDO**

	Párrafos
Antecedentes	1-3
Introducción	4-9
Ámbito de aplicación	10
Criterios funcionales para los Métodos de Análisis de Residuos Múltiples (MRM)	11-39
Características funcionales de la detección de los MRM	11-16
Características funcionales para la cuantificación de los MRM	17-29
Características funcionales para confirmar los MRM	30-39
Características de funcionamiento general a usarse en el programa de control reglamentario	40-43
Otras consideraciones	44-47
Tablas 1 a 6	
Glosario de términos	
Abreviaciones	

**Antecedentes**

1. En el año 2008 la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) adoptó las directrices para el diseño y la implementación de programas reglamentarios nacionales de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos (CAC/GL 71-2009). Estas directrices fueron diseñadas para incluir una orientación general respecto a la validación de los métodos analíticos a usarse con analitos individuales bajo condiciones de una validación realizada por un solo laboratorio (como se establece en la directriz CAC/GL 71-2009) y para ser actualizadas según fuera necesario para permitir su extensión y así lograr abarcar otras áreas pertinentes.
2. El CCRVDF en su 18ª reunión, reconoció que las prácticas actuales en los laboratorios de análisis dedicados a éstos, consistían en utilizar métodos de análisis para residuos múltiples (MRMs) siempre que fuera posible, para aumentar la eficacia de los laboratorios, manteniendo al mismo tiempo los costos de análisis a un mínimo. No obstante, en la misma reunión también se reconoció que existía una orientación muy limitada sobre las características funcionales de los MRMs. Por lo que el objetivo de este documento de orientación es abordar esta necesidad.
3. Se reconoce que los países en desarrollo podrían necesitar un período de transición y/o asistencia técnica al intentar utilizar estas directrices.

**Introducción**

4. Los métodos de análisis para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos deberán ser capaces de detectar más fielmente la presencia de un medicamento veterinario de interés o preocupación (métodos de selección), cuantificar qué cantidad está presente (métodos cuantitativos) e identificar sin duda alguna al

medicamento (métodos de confirmación). Cuando se ha utilizado un método de análisis para determinar que se ha superado el límite máximo de residuos (LMR) definido para un medicamento veterinario aprobado, es imperativo que los resultados de las pruebas sean confirmados antes de que se tomen medidas reglamentarias. Las medidas reglamentarias podrían incluir negar la entrada del producto al mercado, destruir el producto y/o la imposición de sanciones pecuniarias. En los casos donde el medicamento veterinario detectado no esté permitido o se prohíba su uso en ese producto porque no se ha definido una ingesta diaria admisible (IDA) ni un LMR por motivos toxicológicos, la detección de dicho medicamento en cualquier concentración debería ser confirmada, ya que esta conclusión podría resultar automáticamente en medidas reglamentarias.

5. En los documentos de directrices técnicas publicadas por la CAC para ayudar a los países involucrados en el control de las importaciones y exportaciones de alimentos en la aplicación de requisitos para el comercio de productos alimentarios, a fin de proteger al consumidor y facilitar el comercio, se recomienda que los laboratorios que participen en análisis reglamentarios “cumplan con la guía ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos generales de competencia para laboratorios de calibración y ensayo”. Los laboratorios también deberían participar en planes adecuados de pruebas de competencia para el análisis de alimentos, que se ajusten a los requisitos establecidos en el “Protocolo internacional armonizado de pruebas de competencia para laboratorios de análisis (químicos)” y, siempre que se disponga de ellos, usar métodos de análisis que hayan sido validados conforme a los principios establecidos por la CAC (véase el documento CAC/GL 27-1997). Además, los laboratorios deberán usar procedimientos de control interno de la calidad que se ajusten a procedimientos tales como los descritos en “*The Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Applied Chemistry Laboratories*” (Directrices armonizadas para el control de calidad interno aplicado en laboratorios químicos). La sección 5.4.5 ISO/IEC 17025:2005 presenta una orientación general para el uso de métodos de validación.

6. Los métodos de análisis validados son métodos con parámetros operativos característicos definidos que han sido determinados adecuados para usarse en un programa de control reglamentario (idóneos para la finalidad prevista en un ambiente regulatorio). Con la directriz CAC/GL 49-2003 la CAC ha adoptado la directriz para la validación de métodos de análisis de un solo laboratorio emitida por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (UIQPA) [REFERENCIA: M. Thompson, S.L.R. Ellison y R. Wood. “Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis” *Pure Appl. Chem.*, 74 (5), 835-855 (2002)]. Éstos también han sido incorporados en “Los criterios generales para la selección de métodos de análisis validados por un solo laboratorio” contenidos en la 20ª edición del Manual de Procedimientos de la CAC. Este documento de orientación revisa los atributos de los MRMs usados para identificar una gama de analitos en el mismo análisis, así como los requisitos que deben satisfacer antes de que puedan ser considerados adecuados para su uso en programas de control reglamentario para los residuos de medicamentos veterinarios contenidos en los alimentos.

7. El CCRVDF preparó una orientación sobre la validación de los métodos de analitos individuales por parte de un solo laboratorio (CAC/GL 71-2009). Sin embargo para incrementar la eficacia y rendimiento en cuanto al procesamiento de muestras, muchos laboratorios están recurriendo al uso de MRMs que pueden ser usados para detectar múltiples analitos de la misma o de diferente clase. Para los efectos del presente documento, un MRM es considerado como aquel método de análisis cuyo ámbito de aplicación incluye tres o más analitos en la misma clase o en más de una clase de medicamentos veterinarios. Los laboratorios utilizan estos MRMs más comúnmente para seleccionar muestras para la detección de la posible presencia de medicamentos veterinarios en las muestras, pero también pueden usarse tanto, para análisis cuantitativos como de confirmación. Por lo anterior, esta orientación abarcará los tres tipos de análisis / métodos y será incluida como un anexo a la directriz CAC/GL 71-2009. Debería señalarse que un MRM validado pudiera incluir algunos analitos cuyas características funcionales para el análisis cuantitativo han sido totalmente validadas, mientras que otros pudieran no cumplir con el criterio de precisión o recuperación para el análisis cuantitativo o los requisitos de los datos para la confirmación del residuo. Cuando un método ha sido validado y por ello considerado adecuado para detectar estos analitos en un límite aceptado (LA) requerido, dicho método pudiera ser usado como un método de selección para tales analitos que, de estar presentes, entonces deberían ser cuantificados usando un método que ha sido validado como adecuado para el análisis cuantitativo de un analito específico o confirmado usando un método de confirmación validado y pertinente, de acuerdo con el criterio proporcionado en la CAC/GL 71-2009.

8. Los principios descritos en esta sección son considerados prácticos y adecuados para la determinación de las características funcionales de los MRMs a ser usados en programas de control reglamentario y están basados en las recomendaciones elaboradas por una consulta de AOAC/FAO/OIEA celebrada en Miskolc, Hungría, en 1999 [REFERENCIA: A. Fajgelj & A. Ambrus Principles and Practices of Method Validation,

Royal Society of Chemistry, 2000]. Todas o un subgrupo de estas mismas características funcionales, pueden usarse para evaluar, durante la validación de un método, si el método es o no adecuado (“idóneo para la finalidad prevista”) para usarse en un ambiente reglamentario. Todas ellas son aplicables igualmente para usarse con los MRMs de análisis para residuos de medicamentos veterinarios.

9. La 20ª edición del Manual de Procedimientos de la CAC proporciona los “Criterios generales para seleccionar métodos de análisis validados por un solo laboratorio”. Las “instrucciones de trabajo para la aplicación del enfoque por criterios en el Codex, Tabla 1: Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios” contenida en este documento son pertinentes para los MRMs como se trata a continuación, así como lo son las “Directrices para el establecimiento de valores numéricos para los métodos de evaluación y/o criterios para el cumplimiento de éstos”. Con la finalidad de lograr una armonización, la orientación respecto a los criterios de funcionamiento de los métodos analíticos aplicados a los residuos de los medicamentos veterinarios debería ser consistente con las directrices generales ya aprobadas por la CAC. Además, la UE publicó recientemente una orientación para la validación y el control de calidad (Documento No. SANCO/10684/2009) para los análisis de residuos de plaguicidas. Dicho documento abarca los métodos de análisis para los MRMs, principalmente para los análisis de confirmación, pero también aborda los métodos de análisis de selección para residuos múltiples usando la espectrometría de masas. Algunos aspectos de este documento han sido incorporados en éste que nos ocupa, donde se consideró apropiado.

### **Ámbito de aplicación**

10. Esta orientación se aplica a los MRMs usados para analizar los residuos de medicamentos veterinarios, inclusive los medicamentos veterinarios y plaguicidas aprobados. Algunos programas de control de residuo pudieran incluir grupos de analitos adicionales tales como plaguicidas agrícolas y contaminantes medioambientales. La orientación respecto a la validación de los métodos de multi residuos para el uso no veterinario de los plaguicidas está contenida en la directriz CAC/GL 40-1993: *Directrices sobre buenas prácticas de laboratorio en el análisis de residuos de plaguicidas*.

### **Características funcionales para los MRMs**

#### **Características funcionales para los MRMs para los análisis de selección**

11. Mientras que las siguientes secciones describen las características funcionales para los métodos de selección, métodos cuantitativos y métodos de confirmación en general, debe quedar claro que estas características deberán definirse y medirse para cada analito enumerado en el ámbito de aplicación del método para residuos múltiples completamente optimizado. El mejor momento para hacer esto es después de que se haya determinado que la elaboración y/o la modificación del método han sido terminadas y que el método no va a ser sometido a ningún cambio ni modificación adicional. En este respecto, los conceptos implicados son muy similares a aquellos descritos en documentos de orientación para la determinación de las características funcionales de un analito en un método para un solo analito.

12. Los métodos de selección son habitualmente de carácter cualitativo o semi cuantitativo y a menudo abarcan una gama de analitos; su objetivo es distinguir las muestras que no contienen residuos detectables por debajo de cierta sensibilidad o concentración de detección (“muestras negativas”) de aquellas que pudieran contener residuos que sobrepasen ese valor (“muestras positivas”). La estrategia de validación, por lo tanto, se enfoca en el establecimiento de una concentración de detección arriba de la cual los resultados son “positivos”, la determinación de un índice estadísticamente fundamentado para resultados tanto “positivos falsos” como “negativos falsos”, la evaluación de interferencias y el establecimiento de las condiciones de uso adecuadas.

13. La “*selectividad*” de un método de selección (binario) cualitativo se refiere a la capacidad de la prueba para determinar que las muestras que resultan en una respuesta negativa son, de hecho, negativas. Un método cualitativo binario tiene dos posibles resultados, por ej., sí/no o positivo/negativo. El método usado también debe tener la capacidad de distinguir la presencia del compuesto o grupo de compuestos elegidos como objetivos, de otras sustancias que pudieran estar presentes en el material de muestra. Ésta no es normalmente tan grande como aquella de un método cuantitativo, porque los métodos de selección con frecuencia aprovechan alguna característica estructural que es común a un grupo o clase de compuestos. Estos métodos, que generalmente corresponden a la categoría de métodos de selección, están frecuentemente fundamentados en la inhibición del crecimiento microbiológico, inmunoensayos o respuestas cromógenas que quizás no

identificarían claramente a un compuesto (analito). La selectividad de un método de selección podría incrementarse cuando se utiliza como un sistema de detección después de aplicar una técnica cromatográfica o alguna otra técnica de separación. Para demostrar una tasa de selectividad de por lo menos el 95 por ciento con un nivel de confianza del 95 por ciento (lo cual se recomienda para las pruebas de selección), se realizan 60 análisis de réplica en materiales representativos de matriz de muestra testigo de un mínimo de seis fuentes distintas. Todos los resultados deberían ser negativos. En comparación, para alcanzar una tasa de selectividad mínima del 99% con una confianza del 95% deberían analizarse 299 muestras, y todas deberían mostrar resultados negativos. Entonces se podrían realizar pruebas adicionales para detectar posibles interferencias y reactividad cruzada al evaluar el material de matriz testigo enriquecido con sustancias que tienen posibilidades de causar interferencia (inclusividad y exclusividad), tales como otros medicamentos que pudieran utilizarse en el tratamiento de animales, posibles contaminantes ambientales, metabolitos de medicamentos o compuestos químicos afines. Nuevamente, estas respuestas deberían ser negativas cuando estos compuestos están presentes en concentraciones que pudieran ser razonablemente previstas en una muestra.

14. En el caso de las pruebas de selección cualitativa, particularmente aquellas que involucran tecnologías de equipos de ensayo que proporcionan dos resultados posibles (presencia o ausencia del analito), los términos: “concentración de detección” o “sensibilidad de detección” o “nivel del punto de corte” se refieren a la concentración más baja a la que se puede detectar con fidelidad un analito elegido como objetivo dentro de los límites estadísticos definidos. Por ejemplo, en el *AOAC Performance Tested Program*™ para equipos de ensayos, se requiere que, a fin de cumplir con el mínimo requisito para la sensibilidad de un índice del 90% con un nivel de confianza del 95%, un mínimo de 30 materiales de muestra exentos de residuos (de preferencia tomados de por lo menos 6 fuentes distintas) enriquecidos con el analito o analitos de interés en la concentración elegida como objetivo, todos deberían producir un resultado positivo. Tres o más resultados negativos constituyen una falla de la prueba de sensibilidad. Si uno o dos de los resultados son negativos, el experimento debería repetirse, y dos resultados negativos constituirían entonces una falla. Se debería repetir el experimento con material conocido dosificado en la concentración elegida como objetivo, si dicho material se encontrara disponible. También pueden utilizarse otros enfoques, tal como se detalla en la orientación publicada por la UE sobre pruebas de selección ([http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline\\_Validation\\_Screening\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/Guideline_Validation_Screening_en.pdf)).

15. La concentración de detección para las pruebas cualitativas binarias para un analito específico se establecen al realizar experimentos de concentración y respuesta, utilizando típicamente 30 réplicas (de por lo menos seis fuentes distintas) enriquecidas en muestras testigo conocidas, de una serie de concentraciones cada vez mayores. También se analizan directamente las mismas 30 muestras testigo (por ej., sin ser enriquecidas) para proporcionar datos de control. Una vez que se han establecido las concentraciones donde los 30 duplicados dan una respuesta negativa y los 30 duplicados que dan una respuesta positiva, el experimento se repite utilizando los materiales de matriz testigo enriquecidos en cuatro concentraciones separadas a intervalos uniformes entre las concentraciones que dieron “todas las respuestas negativas” y “todas las respuestas positivas”. Un grupo adicional se analiza a una concentración 20 por ciento superior a la concentración que dio “todas las respuestas positivas”. El análisis estadístico de los resultados permite al usuario establecer una concentración de detección confiable en el límite de confianza requerido (usualmente del 95 por ciento) [REFERENCIA: Finney, D.J. 1978. *Statistical method in biological assay*. 3rd edition. New York, USA, MacMillan Publishing Co.].

16. Durante la preparación de este documento de orientación, se desarrolló un nuevo concepto patrocinado por la AOAC Internacional que combinó los parámetros cualitativos para la detección de sensibilidad, falsos positivos y falsos negativos (descrito anteriormente) en un solo parámetro denominado “Probabilidad de Detección (PD)”. La PD engloba todos los rangos de concentraciones, tanto cero como no-cero y permite una representación gráfica sencilla de los datos de laboratorio, como una curva de PD graficada por concentración y asociada con barras de error. Usando este enfoque, pueden calcularse pruebas cualitativas con precisión y exactitud [REFERENCIA: Wehling, P., LaBude, R. A., Brunelle, S., & Nelson, T. Probability of detection (POD) as a statistical method for validation of qualitative methods. *J.AOAC International* 94 (1), 335-347, (2011)]. Este parámetro simplificado merece ser considerado al desarrollar experimentos de validación para los métodos de selección binaria cuantitativa de los MRMs.

### **Características funcionales de los métodos cuantitativos para los MRMs**

17. La selectividad se define como la capacidad de un método para determinar analitos específicos en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento análogo (CAC/GL 72-2009). La 20ª

edición del Manual de Procedimientos de la CAC especifica en el “Cuadro 1: Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios” los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC) esperados para los distintos niveles aplicables y que pueden ser usados para seleccionar una concentración de detección apropiada para una prueba. Es la capacidad de un método de análisis para detectar y distinguir la respuesta de la señal de un compuesto en la presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en el material de muestra; es de particular importancia en la definición de las características funcionales de los métodos utilizados en los programas de control reglamentario para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Hay dos aspectos que deben tomarse en consideración, la capacidad del método de proporcionar una respuesta de señal que esté exenta de interferencias, de otros compuestos que pudieran estar presentes en una muestra o extracto de muestra, y la capacidad del método de identificar sin lugar a duda la respuesta de una señal como una respuesta exclusivamente relacionada con un compuesto específico. Para un método cuantitativo, el requisito es que la señal utilizada para la cuantificación, debería estar relacionada solamente con el analito elegido como objetivo y no contener contribuciones de los materiales co-extraídos. Los análisis cromatográficos basados en picos que no tienen una buena resolución, proporcionan resultados cuantitativos menos confiables. El uso de detectores para elementos específicos, longitudes de onda de detección o detectores selectivos de masas que son más específicos a un compuesto o estructura particular, junto con la separación cromatográfica, mejoran la selectividad de los métodos cuantitativos para el análisis de los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos.

18. Además de la selectividad de un método, también se debe demostrar la capacidad de éste para proporcionar un resultado cuantitativo que sea confiable. Esto consiste en dos factores, que pueden contribuir a medir la incertidumbre en los resultados generados con este método:

- el grado de coincidencia entre el resultado y el valor verdadero de la concentración del analito presente en el material de muestra, expresado como *exactitud*, *veracidad* o *sesgo*; y
- la capacidad del método para proporcionar resultados con alto grado de coincidencia en determinaciones independientes (o valor aceptado en el caso de un material de referencia), expresado como *precisión* (*repetibilidad* y *reproducibilidad*).

19. Se recomienda que los métodos utilizados para respaldar los LMR del Codex cumplan con los valores normalizados especificados para la veracidad y la precisión enumerados en la Tabla 1. Estas normas son las mismas que los límites actuales aplicados para residuos de medicamentos veterinarios para un solo analito en la directriz CAC/GL 71-2009 y al tomar en consideración los datos de aquellos laboratorios que usan MRMs se sugiere que pueden ser adoptados para éstos, especialmente si los análisis de confirmación se realizan usando diferentes métodos analíticos más adecuados y específicos para analitos individuales.

20. La *exactitud* (veracidad, sesgo) de un método podría determinarse mediante el análisis de un material de referencia certificado, al comparar los resultados con aquellos obtenidos con otro método para el que los parámetros funcionales han sido rigurosamente establecidos con anterioridad (típicamente, un método estudiado en colaboración) o, a falta de materiales de referencia o de métodos validados por un estudio entre laboratorios, mediante la determinación de la recuperación de un analito con el que se enriqueció un material de muestra testigo conocido. Cuando sea posible, se exhorta el uso de controles de calidad analítica análogos o un control interno, ya que pudiera mejorar la exactitud de las mediciones, la precisión del análisis y permitir el uso de límites más estrictos que aquellos dados en la columna de veracidad en la Tabla 1. Los requisitos de los métodos en materia de exactitud variarán según el uso reglamentario previsto de los resultados. La exactitud debería ser detenidamente caracterizada a concentraciones próxima al LMR o a la concentración elegida como objetivo para los efectos de las medidas reglamentarias (típicamente a concentraciones de 0.5 a 2.0 veces la concentración elegida como objetivo) para asegurar que la medida reglamentaria se aplique solamente a las muestras que contienen residuos que sobrepasan el límite impuesto por la medida reglamentaria cuando esto puede demostrarse con una confianza estadística definida. Cuando no se disponga de orientación alguna para proveer la concentración objetivo, se propone la adopción de un valor interno en un rango de 1.0 a 10 µg/kg siempre y cuando se cuente con la confianza razonable de que no habrá implicaciones toxicológicas importantes mientras se busca un consejo más formal.

21. La *recuperación* se expresa habitualmente como el porcentaje del analito determinado experimentalmente, después de la fortificación del material de muestra a una concentración conocida, y debería evaluarse a lo largo de concentraciones que cubren la escala analítica del método. En la interpretación de recuperaciones, es necesario reconocer que es posible que el analito añadido a una muestra, no se comporte de la misma manera que el mismo analito acumulado biológicamente (residuo de medicamento veterinario). En muchas situaciones,

la cantidad de un residuo dosificado o acumulado que es extraído (el producto o la fracción recuperada) es menor que la cantidad total de residuos dosificados o acumulados que se encuentra presente. Esto podría ser el resultado de pérdidas que ocurren durante la extracción, la unión intracelular de los residuos, la presencia de conjugados u otros factores que no son totalmente representados por los experimentos de recuperación realizados con los tejidos testigo enriquecidos con el analito y la recuperación variará de acuerdo con la concentración presente del residuo. Independientemente de cuál sea el promedio de recuperación observado, se desea la recuperación con una variabilidad baja, de manera que se pueda hacer una corrección confiable correspondiente a la recuperación para el resultado final, cuando sea necesario. Las correcciones de recuperación deberían aplicarse de conformidad con los criterios establecidos en la orientación proporcionada por la Comisión del Codex Alimentarius (CAC/GL 37-2001).

22. La *precisión*, que cuantifica la variación entre las mediciones duplicadas de las porciones de ensayo del mismo material de muestra, es también una consideración importante para determinar cuándo se considera que el residuo en una muestra sobrepasa un LMR o algún otro límite impuesto por las medidas reglamentarias. La precisión de un método suele expresarse en función de la variación intra-laboratorio (*repetibilidad*) y la variabilidad entre laboratorios (*reproducibilidad*) cuando el método ha sido sometido a un estudio realizado por varios laboratorios. Para la validación de un método realizada por un solo laboratorio, se debería determinar la precisión a partir de experimentos realizados en días diferentes, utilizando un mínimo de seis grupos de tejidos diferentes, lotes de reactivos diferentes, de preferencia con diferente equipo, etc., y, de preferencia, por analistas diferentes. La precisión de un método suele expresarse como la desviación estándar. Otro término útil es la desviación estándar relativa, o el coeficiente de variación (la desviación estándar, dividida entre el valor absoluto de la media aritmética). También puede ser expresada como un porcentaje al multiplicar la magnitud por cien.

23. Por lo general, los métodos cuantitativos están fundamentados en una comparación de la respuesta de un analito en una muestra frente a la respuesta de patrones del analito en solución a concentraciones conocidas. En la elaboración y la validación del método, primero se debería determinar la curva de calibración para evaluar la respuesta del detector a patrones a lo largo de una escala de concentraciones. Estas concentraciones (un mínimo de cinco, más el testigo) deberían abarcar la escala de interés analítico completa, y la curva resultante debería expresarse estadísticamente. Sin embargo, aunque la inclusión de un testigo adecuado con las muestras de calibración es una práctica recomendada, esto no implica que sea aceptable aplicar extrapolaciones en la región de la curva inferior al patrón más bajo, para obtener un resultado cuantitativo. La función analítica relaciona la respuesta para el analito recuperado del material de muestra en varias concentraciones a lo largo de la escala de interés analítico, en donde el valor de todas las interferencias permanece constante. Por ello queda implícito que, bajo tales circunstancias, la función analítica se deriva de la presencia de los reactivos usados en el método y los co-extractos de la matriz más no de las mediciones usando soluciones puras estándar por sí solas, a menos de que se haya demostrado adecuadamente que la detección de la señal de respuesta del estándar puro, no se ve afectado por la presencia de los reactivos del método y los componentes de la matriz. Con respecto a los analitos para los que se ha establecido un LMR o un límite de medidas reglamentarias en un material de muestra particular (matriz), la respuesta es típicamente determinada para un material de muestra testigo conocido y para un material de muestra testigo conocido enriquecido, en una escala de concentraciones superiores e inferiores al LMR (se recomienda el uso de 6 distintas fuentes de materiales testigo).

24. Puede existir un cierto grado de ambigüedad en la literatura científica relacionado con los términos “matriz robusta” y “matriz combinada”. Se ha propuesto una terminología para clarificar esta postura (REFERENCIA: Wang, J., Cheung, W., & Grant, D. (2005) Determination of pesticides in apple-based infant foods using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, J. Agric. Food Chem. 53: 528-537) y las definiciones a continuación serán usadas en este texto.

- Curva de calibración patrón (CCP) – una curva de calibración preparada usando patrones, al no contar con una matriz; normalmente es referida en la literatura como una “calibración externa”;
- Curva de calibración patrón ajustada a la matriz (CCPAC) – una curva de calibración preparada añadiendo los patrones a los extractos de la muestra obtenidos de matrices testigo luego de la extracción; y
- Método para una curva de calibración patrón ajustada a una matriz combinada (MCCPAMC), pero también es conocida como una curva de calibración patrón de una matriz robusta – una curva de calibración preparada añadiendo los patrones a una matriz testigo antes de la extracción.



25. Los datos del experimento de la función analítica también pueden ser utilizados para calcular la recuperación analítica de cada concentración y son de particular importancia cuando la presencia de co-extractantes de la matriz modifica la respuesta del analito en comparación con los patrones analíticos. La regresión, ya sea lineal o cuadrática se determina a partir de los experimentos de la función analítica y es la expresión estadística de la curva obtenida para el análisis de los materiales de muestra enriquecidos en las concentraciones elegidas como objetivo, luego de que se ha demostrado que los datos satisfacen los requisitos para una regresión lineal. Debería tomarse en consideración la ponderación para la regresión tal como  $1/x$ ,  $1/x^2$ , etc., especialmente para el análisis de residuos sólo después de que se hayan realizado las pruebas de análisis residual apropiadas, para determinar el factor de ponderación basado en la homocedasticidad o en los datos. La regresión lineal o cuadrática ponderada puede mostrar el límite inferior de cuantificación (LC) con un mayor grado de exactitud y mejorar la precisión. Es cada vez más común en los métodos de análisis para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, el basar la determinación cuantitativa en una curva estándar preparada mediante la adición de un patrón a un testigo conocido del material representativo de la matriz antes de la extracción del analito, en una escala de concentraciones adecuadas que abarcan el valor elegido como objetivo (la función analítica). El uso de una “curva estándar de tejidos” de tal índole para la calibración, incorpora una corrección de la recuperación en los resultados analíticos obtenidos.

26. La definición aceptada para la *sensibilidad* (CAC/GL 72-2009) es: “El cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición”, una propiedad asociada con la pendiente de la curva de calibración y la habilidad de discriminar los cambios en la concentración del analito. También es necesario establecer los límites inferiores en los que la detección, cuantificación o confirmación confiable de la presencia de un analito puede realizarse utilizando un método de análisis en particular. El *límite de detección (LD)* de un método está definido en la directriz CAC/GL 72-2009 y puede describirse en términos prácticos como la concentración más baja donde el analito puede detectarse, pero es posible que no pueda identificarse o confirmarse. Sin embargo, existe una opinión creciente de que esto pudiera no ser una característica útil a determinar, dada la variabilidad inherente asociada con los distintos detectores y otros factores. Por otro lado, se sugiere que el LD solo puede determinarse cuando los requisitos de funcionamiento del método se acercan al límite. Puede estimarse utilizando la desviación estándar ( $s_{y/x}$ ) del análisis de regresión lineal de la curva estándar generada en el experimento de la función analítica descrito anteriormente (REFERENCIA: Miller, J.C. & Miller, J.N. 1993. *Statistics for analytical chemistry*. 3rd Edition. Chichester, UK, Ellis Horwood Ltd.). Con el uso de este enfoque el LD se calcula utilizando la ordenada en el origen (suponiendo un valor positivo) de la CCP o MCCPAMC de la curva más tres veces el valor de  $s_{y/x}$ . Este enfoque proporciona una estimación moderada del límite de detección, que también puede ser estimado mediante mediciones en materiales de ensayo representativos como la respuesta más débil del analito en el testigo más tres veces su desviación estándar. Con frecuencia, cuando se utiliza este enfoque, es necesario enriquecer los materiales de ensayo a una concentración que resulta en una respuesta apenas detectable para obtener una aproximación de la desviación estándar del testigo.

27. El *límite de cuantificación (LC)* puede establecerse a partir de los mismos experimentos utilizando la ordenada en el origen de la curva más diez veces el valor de  $s_{y/x}$ . En el caso de los métodos utilizados para respaldar los LMRs establecidos por la Comisión del Codex Alimentarius, el LC debería cumplir con los criterios de precisión y exactitud (recuperación) de la Tabla 1 y debería ser igual o menor que la mitad del valor del LMR. Sin embargo, cuando el LC de un método es menor que las concentraciones reales vigiladas para determinar el cumplimiento con un LMR, la validación y la aplicación ulterior del método deberían basarse en el *nivel calibrado más bajo (NCMB)*, que es típicamente 0.5 veces el valor del LMR. Para los efectos de un programa reglamentario, los límites de detección y de cuantificación son parámetros importantes cuando el método será aplicado para estimar exposiciones a residuos, donde pudiera haber un interés en la vigilancia de residuos a concentraciones inferiores al LMR, o cuando se aplican análisis de residuos para sustancias para las que no hay una IDA ni un LMR establecidos. Para la vigilancia del cumplimiento con un LMR, es importante que se incluya en el análisis un NCMB, que demuestre adecuadamente que la concentración del LMR puede ser determinada con una confianza razonable. El NCMB de un método utilizado para respaldar un LMR no debería ser menor al LC. En el *Manual de Procedimiento del Codex* se recomienda el término *límite de determinación* en la sección de “Términos que han de utilizarse en el enfoque por criterios”.

28. Durante la consulta en Miskolc en 1999 se reconoció que podrían aplicarse otros enfoques a la validación de métodos, e incluyó los términos "límite de adopción de decisiones" (CC $\alpha$ ) y "capacidad de detección" (CC $\beta$ ) en su examen. Estos términos se definen en el glosario incluido al final del presente documento, y han sido adoptados para su uso en algunas jurisdicciones, p. ej., en la Unión Europea bajo la Decisión 2002/657/EC de la Comisión Europea, y deberían aceptarse como una alternativa al uso de los términos LD y LC.

29. La *Incertidumbre de la medición* está definida en la directriz CAC/GL 72-2009 como "el parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores que se atribuyen a un mesurando sobre la base de la información utilizada". No existe un enfoque estándar consensuado para calcular la incertidumbre de la medición, y se han publicado varios enfoques al respecto [REFERENCIA: CAC/GL 59-2006: Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados (Anexo, modificado en 2011). REFERENCIA: Especificaciones técnicas ISO/TS 21748:2004: Directrices para estimar la repetibilidad, reproducibilidad y veracidad en la estimación del cálculo de la incertidumbre. Primera edición 2004-03-15.]. La norma ISO/IEC 17025:2005 requiere que los laboratorios determinen y proporcionen la incertidumbre asociada con los resultados analíticos. La norma SANCO/10684/2009 sugiere un enfoque práctico para que los laboratorios estimen la medición de la incertidumbre, además de verificar su estimación en base a sus propios datos internos a través de la evaluación de su desempeño durante los análisis de competencia.

### **Características funcionales de los métodos de confirmación para los MRMs**

30. Los pasos necesarios para lograr una identificación positiva dependen del criterio del analista, debiendo prestarse atención particular a la elección de un método que reduzca al mínimo los efectos de compuestos que interfieren en el análisis. En última instancia, es responsabilidad del analista el tomar decisiones, proporcionar datos de apoyo e interpretar los resultados de acuerdo a los principios científicos, usando su criterio profesional. [REFERENCIA: Bethem, R., Boison, J. O., Gale, J., Heller, D., Lehotay, S., Loo, J., Musser, J., Price, P., & Stein, S. Establishing the Fitness for Purpose of mass spectrometric methods. J. Amer. Chem. Society for Mass Spectrometry 14 (5) 528-541(2003).].

31. La *selectividad*, es la capacidad del método de identificar inequívocamente una señal de respuesta como exclusivamente relacionada con un compuesto específico, y es la consideración primaria en los métodos de confirmación. Ciertas técnicas instrumentales, tales como la espectroscopia por rayos infrarrojos de Fourier o la EM, pueden ser lo suficientemente selectivas como para ofrecer una identificación inequívoca. Éstas son frecuentemente las técnicas en las que se basan los métodos de confirmación.

32. Normalmente la confirmación por CG/EM se basa en el análisis de un analito de referencia, contemporáneo a aquellos desconocidos y requiere de la adquisición de señales para tres iones diagnósticos CG-(MIS)/EIMS (por ej., tres valores m/z, los denominados "criterio de tres iones") aproximando la resolución de la unidad de masa, con una abundancia relativa de tolerancias combinadas en mediciones de monitoreo de iones seleccionados (MIS). [REFERENCIA: Sphon, J. A. (1978) J. Assoc. Official Anal. Chemists. Use of mass spectrometry for confirmation of animal drug residues Chemists 61 (5), 1247-1252 (1978)]. En este proceso se asume tácitamente que la retención del tiempo de CG también se ajusta al del patrón de referencia. El enfoque de Sphon, considerado valioso y científicamente válido, usa un enfoque de exclusión de posibilidades sin declarar una identificación positiva.

33. En 1996, Li *et al.* extendió "el criterio de tres iones" de Sphon a métodos CL-Ionización por asperción de electrones (IAE) EM/EM. Bajo las condiciones de CL-EM/EM, al menos dos y preferentemente tres pares de iones precursores de producto se usaron para reemplazar el criterio de tres iones de la espectrometría de masas, el cual se encontró ser apropiado para la CG-IE/EM [REFERENCIA: Li, L. Y. T., Campbell, D. A., Bennett, P. K., y Henion, J. (1996) Anal Chem. 68, 3397]. De acuerdo con el criterio de Li, se requiere de un ión precursor, de preferencia el ión  $[M+H]^+$  o el ión  $[M-H]^-$  y dos fragmentos de iones estructuralmente importantes (o iones de transición de producto) junto con datos del tiempo de retención, para lograr los criterios de funcionamiento requeridos para los métodos reglamentarios. Sin embargo, la confianza en la identificación se incrementará con el uso de un mayor número de fragmentos iónicos estructuralmente importantes (o transición de producto) o puntos de identificación, además, algunos laboratorios pudieran escoger usar más del mínimo sugerido.

34. Las tablas 2 y 3 muestran el plan de puntos de identificación (PI) publicado en la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/EC y refrendado por el CCRVDF [REFERENCIA: CAC/GL 71-2009]. Se considera que los métodos fundamentados en la espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) ofrecen una confiabilidad mayor al realizar mediciones de masa más precisas, que la que puede obtenerse utilizando técnicas de espectrometría de masas de baja resolución (EMBR). En la Tabla 4 se establecen los requisitos funcionales del método para los métodos de confirmación fundamentados en la cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG/EM) de baja resolución y en cromatografía de líquidos / espectrometría de masas (CL/EM) de baja resolución, según su publicación en la Decisión 2002/657/EC de la Comisión Europea y por un órgano internacional de expertos, [REFERENCIA: Bethem, R., Boison, J. O., Gale, J., Heller, D., Lehotay, S., Loo, J., Musser, J., Price, P., & Stein, S. Establishing the Fitness for Purpose of mass spectrometric methods. J. Amer. Chem. Society for Mass Spectrometry 14 (5) 528-541(2003).]. El sistema de PI (Tabla 2) está basado en la asignación arbitraria de un PI para cada fragmento de ión detectado usando un método de espectrometría de masas de baja resolución. Cuando se utiliza un instrumento en serie de baja resolución, los fragmentos secundarios se detectan a partir de un fragmento primario aislado en la primera fase del instrumento. El hecho de que estos fragmentos estructuralmente importantes se produzcan a partir de la fragmentación de un fragmento principal (ión precursor) relacionado con la molécula, proporciona un nivel de confianza mayor, y a cada ión secundario de transición se le asigna un valor de 1.5 puntos de identificación. Por tanto, el conjunto de un ión precursor y de dos iones secundarios de transición proporciona los 4 puntos de identificación necesarios cuando se utilizan instrumentos de EM/EM de baja resolución en un método de confirmación (Tabla 3).

35. Cuando se utilizan los espectrómetros de masa de alta resolución en un método de confirmación, se proporciona un nivel de confianza adicional, puesto que la alta resolución proporciona una identificación más precisa de la masa y puede utilizarse para predecir la composición elemental de cada fragmento. En el caso de un solo espectrómetro de masa de alta resolución, a cada fragmento estructuralmente importante detectado se le asigna un valor de dos puntos de identificación, mientras que a los iones secundarios de transición que se generan en los experimentos de EM/EM de alta resolución se les asigna un punto de identificación con un valor de 2.5 cada uno (Tabla 2).

36. Sin importar la resolución del espectrómetro de masa, además, se debe medir por lo menos un índice iónico para eliminar la posibilidad de que surjan fragmentos de la misma masa, a partir de compuestos isobáricos con una estructura análoga. Cuando se utilizan los espectrómetros de masa de alta resolución, también deberían determinarse los tiempos de retención, o mejor aún, los tiempos relativos de retención, para así evitar la posibilidad de identificaciones falsas. Asimismo, también debería considerarse la determinación de una señal de ruido.

37. Ya que con mayor frecuencia es más accesible, la adquisición de espectrómetros de masa de alta resolución y por ende se usan más comúnmente, se sugiere que pudiera asignarse PIs basados en la exactitud de la medición de la masa usando errores relativos de masa, en lugar del poder de resolución (Tabla 3). Esto tiene la ventaja de que el criterio de clasificación del PI es consistente en todo un rango de masa o independiente de ésta. Por ello, para las sustancias con un LMR establecido, se necesita monitorear al menos dos iones para lograr un mínimo de tres PIs para confirmar satisfactoriamente la identidad del compuesto con errores de masa que sean  $\leq 5$  ppm. Al usar una fragmentación en la fuente o una disociación inducida por choque, con una fragmentación baja y alta o energía de choque, un detector de electrones (TOF) y/o una trampa de electrones (Orbitrap) individual o en serie podrían lograr un espectro abundante de fragmentos, además de que pudiera asignarse con ello, PIs adicionales para confirmar los resultados.

38. Otras técnicas, utilizadas conjuntamente, pueden ser capaces de lograr un grado de selectividad análogo al de las técnicas de confirmación. Por ejemplo, la identificación podría verificarse mediante el uso de una combinación de los siguientes métodos:

- la cromatografía en capa fina;
- la cromatografía gas-líquido y específica para un elemento y sistemas de detección que la acompañan;
- la formación de derivados característicos seguida de una cromatografía adicional; o
- la determinación de los tiempos relativos de retención específicos del compuesto utilizando diversos sistemas cromatográficos de diferente polaridad.

Tales procedimientos deben ser aplicables al LMR designado para el analito.

39. Cuando no se dispone de un método de confirmación tal como la espectrometría de masas, la información sobre la selectividad relacionada con el análisis de un residuo específico de medicamentos veterinarios en una muestra puede obtenerse de varias fuentes. [REFERENCIA: Guidelines for the implementation of Decision 2002/657/EC, SANCO/2004/2726rev2, Anexo 1: *SPECLOG – the specificity log*; [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/cons\\_2002-657ec\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/cons_2002-657ec_en.pdf)]. Esta información puede capturarse en un documento de registro estructurado en donde se vierta toda la información en la que se ha basado la conclusión de que un método ha detectado un compuesto específico en una muestra, en una concentración medida como se informó. A pesar de que no hay una sola medición o análisis que pueda proporcionar la prueba inequívoca de la identidad de un compuesto y/o la cantidad presente que se desea, la información combinada que ha sido reunida proporciona pruebas de que el analista ha realizado un esfuerzo serio para llegar a un resultado lógico y coherente con los datos y con otra información disponible.

### **Características funcionales generales para los MRMs a utilizarse en un programa de control reglamentario**

40. Hay algunas consideraciones adicionales para la selección de métodos adecuados a utilizarse en un programa de control reglamentario para los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Los métodos deberían ser resistentes (robustos), eficaces en función de los costos, relativamente sencillos, transportables y capaces de manejar simultáneamente un conjunto de muestras de modo eficaz en función del tiempo. También se debe determinar la estabilidad de los analitos.

41. La prueba de *rigurosidad (robustez)* debería realizarse utilizando el enfoque del diseño factorial estándar para determinar cualquier punto crítico de control donde las variaciones mínimas en el método pudieran arrojar resultados analíticos estadísticamente distintos. [REFERENCIA: Youden, W.J. & Steiner, E.H. 1975. *Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*. Gaithersburg, USA, AOAC International.]. Los factores típicos a incluirse en un diseño incluyen variaciones en los volúmenes o concentraciones de los reactivos, pH, tiempo y temperatura de incubación o de reacción, calidad de los reactivos y distintos lotes o fuentes de un reactivo o material cromatográfico. También podrían realizarse pruebas de rigurosidad usando otros diseños tales como el enfoque de Plackett-Burman. Podría ser necesario aplicar la prueba de rigurosidad a un método de confirmación, si el método difiere considerablemente del método cuantitativo previamente validado (por ej., si el método utiliza distintos procedimientos de extracción o de derivación de aquellos que se utilizan en el método cuantitativo).

42. La *eficacia en función del costo* se refiere al uso de reactivos e insumos en la pureza requerida, que pueden conseguirse fácilmente a través de los proveedores locales, y al equipo, cuyas partes y servicio también pueden conseguirse fácilmente. La *eficacia del método* aumenta cuando se pueden analizar varias muestras al mismo tiempo. Esta característica reduce el tiempo necesario para el análisis de una muestra y habitualmente reduce el costo por muestra, debido a que hay ciertos costos fijos relacionados con el análisis de muestras, independientemente de si se trata de una o varias. La capacidad de un método de abarcar múltiples muestras en un lote es importante cuando se deben analizar grandes números de muestras en marcos cortos o fijos de tiempo. La *transportabilidad* es la característica del método de análisis que le permite ser trasladado de un lugar a otro sin perder las características analíticas funcionales establecidas.

43. Mientras una muestra está en espera de análisis, debe establecerse la *estabilidad del analito* durante el análisis, tanto para los patrones como para el analito en la presencia del material de muestra, durante el procesamiento a lo largo del análisis total para todos los métodos utilizados en un programa de control reglamentario y para las condiciones típicas de almacenamiento. El período elegido de estabilidad durante el almacenamiento, debería cubrir el tiempo previsto para el almacenamiento del material de muestra relativo a todos los análisis necesarios, que incluyen el uso de los métodos de selección, los métodos cuantitativos y los métodos de confirmación. Es prudente realizar el estudio de almacenamiento para un período que se extienda por lo menos 90 días más allá del tiempo previsto para la conclusión de todos los análisis de selección, cuantitativos y de confirmación y para el informe de los resultados, en caso de que éstos se cuestionen y se solicite un re análisis. También es prudente evaluar el efecto que el ciclo de congelación y descongelación tendría en la estabilidad de los analitos bajo condiciones de congelación. Esto permitirá que se tome una decisión con respecto a si una muestra, una vez descongelada para análisis, puede o no ser devuelta a su almacenamiento y analizada nuevamente en una fecha posterior sin sufrir un cambio significativo al compararse con el resultado del análisis anterior. El almacenamiento o manejo incorrecto de las muestras

puede llevar a obtener resultados erróneos y en los casos donde los resultados analíticos sean cuestionados, deberá seguirse la orientación dada en la directriz CAC/GL70-2009.

### Otras consideraciones

44. De preferencia, debería elaborarse un método de análisis para residuos de medicamentos veterinarios, y caracterizarse para el análisis de los cuatro principales tejidos que generalmente se clasifican como “tejidos comestibles”, los cuales son: grasa, hígado, riñón y músculo. Además, la leche, los huevos y la miel son objeto del comercio internacional, y también podrían necesitarse métodos de análisis para estas matrices. Las preferencias alimentarias locales podrían plantear la necesidad de métodos para otros tejidos que normalmente se consumen en un país o región. Además, podría haber algún requisito reglamentario para el análisis de orina u otros líquidos corporales para la determinación de residuos, especialmente si los ensayos con animales vivos forman parte de un programa reglamentario. Desde un enfoque práctico, el mínimo requisito habitual es que debería elaborarse un método de análisis para lo que normalmente se conoce como “tejido elegido como objetivo”, que es el tejido de un animal tratado en el que se espera encontrar las concentraciones más altas y más persistentes del residuo del medicamento. Éste sería normalmente el tejido obtenido para un programa nacional de vigilancia de residuos. Además, hay un requisito para evaluar el “tejido objeto del comercio” cuando los productos se envían de un país a otro. Éste es más comúnmente el tejido muscular, pero se pueden incluir otros tejidos y alimentos procesados tales como: queso, carnes ahumadas y pescado procesado. En la Tabla 6 se presenta una orientación general en cuanto a la selección de tejidos elegidos como objetivo adecuados y los “tejidos objetos del comercio” previstos, así como también en los informes del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA). De preferencia, deberían obtenerse conocimientos del metabolismo y de la distribución y eliminación en los tejidos para cada residuo de medicamentos antes de que se haga una selección final de los tejidos apropiados para la validación.

45. La concentración de los analitos utilizados para caracterizar un método, debería ser seleccionada de manera que comprenda los límites aceptados (LA) de todos los analitos que se prevé buscar en todos los productos.

46. Una vez que los siguientes parámetros, resumidos a continuación, son determinados experimentalmente para todos los analitos incluidos en el ámbito de aplicación de un método para residuos múltiples, entonces se podrá considerar que el método está listo para continuar siendo evaluado a través de un proceso de validación para determinar si el método es adecuado (es decir, “idóneo para la finalidad prevista”) para utilizarse en un programa de control reglamentario para medicamentos veterinarios en la producción de animales destinados a la alimentación humana.

47. Fajgelj *et al* [REFERENCIA: A. Fajgelj & A. Ambrus Principles y Practices of Method Validation, Royal Society of Chemistry, 2000] proporciona mayor orientación sobre la importancia de los parámetros descritos a continuación y cómo pueden ser evaluados.

#### (a) Selectividad

- (i) Libre de interferencias – todos los analitos objetivo serán identificados cromatográficamente.
- (ii) Efectos de la matriz – caracterizados, además de que deberá tomarse la acción correctiva.
- (iii) Determinación de la detección de la respuesta de los parámetros cualitativos, cuantitativos y/o de confirmación.

#### (b) Calibración

- (i) Sensibilidad.
- (ii) Escala de calibración.
- (iii) Función de calibración.
- (iv) LD y LC.

#### (c) Confiabilidad de los resultados

- (i) Recuperación.
- (ii) Exactitud (veracidad, sesgo).

- (iii) Precisión y medida de incertidumbre.
- (d) Transportabilidad del método
  - (i) Identificación de los puntos de control crítico.
  - (ii) Identificación de los posibles puntos de obstaculización.
  - (iii) Pruebas de robustez (rigurosidad).
- (e) Estudios de estabilidad
  - (i) Estabilidad del analito en extractos de muestra y soluciones estándar; estabilidad del analito en el procesamiento y el análisis de la muestra.
  - (ii) Estabilidad del analito bajo condiciones de almacenamiento en congelador y ciclos de congelación y descongelación.
- (f) Estudios de residuos no añadidos (si se dispone de materiales adecuados)
  - (i) Verificar el funcionamiento de todos los pasos, inclusive el método para liberar residuos vinculados.
  - (ii) Verificar la consistencia de la recuperación y la precisión.
  - (iii) Verificar la estabilidad del analito bajo condiciones de almacenamiento en congelador y ciclos de congelación y descongelación.

**Tabla 1: Criterios funcionales a los que deberían ajustarse los MRMs considerados adecuados para utilizarse como métodos de análisis cuantitativos para respaldar a los LMR de medicamentos veterinarios en los alimentos.**

Concentración	Coeficiente de variación (CV)		Veracidad
	Repetibilidad (dentro del laboratorio)	Reproducibilidad (entre laboratorios)	Escala de porcentajes medios de recuperación *
( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	(%)	(%)	(%)
$\leq 1$	36	54	50–120
$1 < a < 10$	32	46	60–120
$10 < a < 100$	22	34	70–120
$100 < a < 1\ 000$	18	25	70–110
$\geq 1\ 000$	14	19	70–110

\* Si a un laboratorio se le exige informar de los resultados analíticos corregidos en función de la recuperación analítica, la precisión para la recuperación es más importante que la recuperación absoluta. Sin embargo, si se informa de los resultados analíticos sin ser corregidos en función de la recuperación analítica, la recuperación absoluta es de importancia fundamental.

**Tabla 2: Relación entre una gama de clases de fragmentos de masas y los puntos de identificación obtenidos**

Técnica de EM	Puntos de identificación obtenidos por ión
Espectrometría de masas de baja resolución (EMBR)	1.0
EMBR <sup>n</sup> ión precursor	1.0
EMBR <sup>n</sup> ión secundario de transición	1.5
Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)	2.0
EMAR <sup>n</sup> ión precursor	2.0 <sup>a, b</sup>
EMAR <sup>n</sup> ión secundario de transición	2.5 <sup>a, b</sup>

Notas:

- Cada ión puede contarse solamente una vez.
- La CG-EM con uso de la ionización electrónica (IE) se considera una técnica distinta de la CG-EM con uso de la ionización química (IQ).
- Pueden usarse distintos analitos para aumentar el número de puntos de identificación sólo si los derivados emplean distintas químicas de reacción.
- Los productos de transición incluyen tanto iones secundarios como iones secundarios de 1<sup>a</sup> generación.
- <sup>a</sup> Con base en la resolución EM  $\geq 10,000$  (10% del valle sobre la escala de toda la masa) o  $\geq 20,000$  ancho a media altura (FWHM) en la escala de la masa de interés.
- <sup>b</sup> Con base en la exactitud de la masa  $< 5$ ppm.

**Tabla 3: Ejemplos del número de puntos de identificación ganados para una gama de técnicas y combinaciones de las mismas (n = un entero)**

Técnica	Fuente de identificación	Número de puntos de identificación
CG/EM(IE o IQ)	N	N
CG/EM(IE +IQ)	2 (IE) + 2 (IQ)	4
CG-IEEM o CG-EMIOQ (2 derivados)	2 (Derivado A) + 2 (Derivado B)	4
CL-EM	N	N
CG-EM/EM	1 ión precursor + 2 iones secundarios	4
CL-EM/EM	1 ión precursor + 2 iones secundarios	4
CG-EM/EM	2 iones precursores, cada uno con 1 ión secundario	5
CL-EM/EM	2 iones precursores, cada uno con 1 ión secundario	5
CL-EM/EM/EM	1 ión precursor, 1 ión secundario y 2 iones secundarios de 1 <sup>a</sup> generación	5.5
Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)	N	2n
CG/EM y CL-EM	2 + 2	4
CG/EM y EMAR	2 + 1	4
CL-EMAR/EM y CG-EMAR/EM	1 ión precursor + 2 iones secundarios	6

**Tabla 4 Requisitos funcionales para fuerzas iónicas relativas (muestra comparada contra un patrón) utilizando varias técnicas de análisis de espectrometría de masas**

Fuerza iónica relativa (% del pico base)	CG/EM (IE) (relativa)	CG/EM(IQ), CG-EM/EM, CL-EM, CL-EM/EM (relativa)
(%)	(%)	(%)
> 50	≤ 10	≤ 20
20-50	≤ 15	≤ 25
> 10- < 20	≤ 20	≤ 30
≤ 10	≤ 50	≤ 50

**Tabla 5: Ejemplos de métodos de detección adecuados para el análisis de sustancias para efectos de confirmación, según fueron recomendados por la Consulta en Miskolc.**

Método de detección	Criterio
CL o CG y espectrometría de masas	Si se controla un número suficiente de fragmentos iónicos
CL/DUVF	Si el espectro ultravioleta es característico
CL /fluorescencia	Junto con otras técnicas
2-D Cromatografía en capa fina (espectrometría)	Junto con otras técnicas
Cromatografía de gases con detección por captura de electrones (CG-DCE), Detector de nitrógeno y fósforo (DNF), Detector fotométrico de flama (DFF)	Sólo cuando se combina con dos o más técnicas de separación <sup>a</sup>
Derivación	En caso de que no haya sido el primer método elegido
CL-inmunograma	Junto con otras técnicas
CL-RUV / visible (longitud de onda única)	Junto con otras técnicas

<sup>a</sup> Otros sistemas cromatográficos (en los que se apliquen fases estacionarias y/o móviles de selectividad diferente) u otras técnicas.

**Tabla 6: Orientación práctica sobre la selección de la matriz de ensayo adecuada para el examen de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos**

Especies / Producto	Tejido seleccionado como objetivo o matriz habitual para la elaboración del método	
	Hidrosoluble	Liposoluble
No rumiantes (por ej., cerdo)*	Hígado o riñón, músculo**	Grasa, músculo
Aves (por ej., pollo, pavo)*	Hígado, músculo	Grasa o músculo sin piel adherida en proporciones normales **
Mariscos / Crustáceos (por ej., camarón)	Músculo	Músculo
Leche (normalmente leche de vaca)	Leche entera	Leche entera
Miel	Miel	Miel
Huevo	Enteros - sin cascarón	Enteros - sin cascarón

\* La elaboración del método y la caracterización de los parámetros de análisis deberían llevarse a cabo para todas las especies principales de las que se obtendrán muestras para las pruebas de rutina. Para aplicaciones de uso secundario, podría ser aceptable demostrar la aplicabilidad del método en la nueva especie si la aplicabilidad del método ha sido demostrada anteriormente en otra especie del grupo (p. ej., rumiantes) y cumple con las normas de funcionamiento verificadas con anterioridad para las especies principales "equivalentes".



\*\* Por lo general, las concentraciones más elevadas de los residuos de compuestos hidrosolubles se encuentran en ya sea en el hígado o en el riñón, y la elección del tejido se hace basándose en estudios de distribución proporcionados por el patrocinador del medicamento, al momento del registro por una autoridad nacional o regional. Los compuestos liposolubles por lo general están presentes como residuos con concentraciones más elevadas en la grasa, así que en tales casos la selección de las matrices de ensayo consiste típicamente en grasa y músculo. No obstante, en el caso de las aves de corral y los pescados, donde la preparación y el consumo de alimentos incluyen frecuentemente tanto el músculo como la piel con grasa, una directriz adecuada podría ser “músculo con piel adherida en proporciones normales”, correspondiendo al tejido mixto de músculo, grasa y piel que puede consumirse. Tales requisitos deberían establecerse claramente con el cliente (el comprador o el usuario de los resultados) antes de comenzar a elaborar el método. Las autoridades nacionales o regionales, o la finalidad de la prueba, podrían requerir la aplicabilidad del método en matrices distintas o adicionales.

\*\*\* Los pescados pueden presentar concentraciones de lípidos elevadas (por ej., los salmónidos) o bajas concentraciones de lípidos (por ej., la tilapia, la perca) y esto puede afectar la selección del método analítico.

## GLOSARIO DE TÉRMINOS\*

Este glosario incluye sólo aquellos términos que no están definidos en la “Directriz de terminología analítica”, CAC/GL 72-2009.

<b>Límite aceptado (LA)</b>	Valor de concentración de un analito que corresponde a un límite reglamentario o valor de referencia que constituye la finalidad del análisis, p. ej. LMR, norma comercial, límite de concentración objetivo (evaluación de la exposición alimentaria), nivel de aceptación (medio ambiente), etc. Para una sustancia que no tiene LMR o para una sustancia prohibida puede no existir un LA (por ser éste igual a 0 o porque no hay límite alguno), o el LA puede ser la concentración objetivo por encima de la cual es necesario confirmar los residuos detectados (límite de adopción de medidas o límite administrativo).
<b>Error alfa (<math>\alpha</math>)</b>	La probabilidad de que la concentración efectiva del analito en la muestra de laboratorio sea inferior a un valor particular (p. ej., el LA) cuando las mediciones efectuadas en una o más porciones analíticas o de ensayo indican que la concentración supera ese valor (positivo falso). Por lo general, los valores aceptados de esta probabilidad son del orden del 1 al 5%.
<b>Error beta (<math>\beta</math>)</b>	La probabilidad de que la concentración efectiva del analito en la muestra de laboratorio sea superior a un valor particular (p. ej., el LA) cuando las mediciones efectuadas en una o más porciones analíticas indican que la concentración no excede ese valor (negativo falso). Por lo general, los valores aceptados de esta probabilidad son del orden del 1 al 5%.
<b>Método de confirmación</b>	Métodos que proporcionan una información completa o complementaria que permite identificar el analito con un grado aceptable de certidumbre [en el límite aceptado o la concentración de interés]. En la medida de lo posible, los métodos de confirmación proporcionan información sobre el carácter químico del analito, utilizando preferiblemente técnicas espectrométricas. Si una técnica particular no posee suficiente especificidad, la confirmación podría efectuarse mediante procedimientos adicionales que consisten en combinaciones idóneas de purificación, separación cromatográfica y detección selectiva. Los bioensayos también pueden proporcionar algunos datos de confirmación. Además de la confirmación de la identidad de un analito, también se deberá confirmar su concentración. Esto podrá lograrse analizando una segunda porción de ensayo y/o volviendo a analizar la porción de ensayo inicial con un método alternativo apropiado (p. ej., columna y/o detector diferente). La confirmación cuantitativa y cualitativa también podrá efectuarse con el mismo método, cuando sea apropiado.
<b>Límite de adopción de decisiones (<math>CC\alpha</math>)</b>	Límite en el cual se podrá decidir que la concentración del analito presente en una muestra efectivamente excede ese límite con una probabilidad de error de $\alpha$ (positivo falso). En el caso de sustancias con LA igual a cero, el $CC\alpha$ es la concentración más baja en la que un método puede discriminar con una probabilidad estadística de $1 - \alpha$ la presencia del analito identificado. El $CC\alpha$ es equivalente al límite de detección (LD) de conformidad con algunas definiciones (habitualmente para $\alpha = 1\%$ ). En el caso de sustancias con LA establecido, el $CC\alpha$ es el valor de medición de la concentración por encima del cual se puede decidir, con una probabilidad estadística de $1 - \alpha$ , que el contenido del analito identificado efectivamente es superior al LA.
<b>Capacidad de detección (<math>CC\beta</math>)</b>	La concentración efectiva del analito más baja que se puede detectar, identificar y cuantificar en una muestra con un error beta (negativo falso). En el caso de sustancias prohibidas, la $CC\beta$ es la concentración más baja a la que un método está en condiciones de determinar el analito en muestras contaminadas con una probabilidad estadística de $1 - \beta$ . En el caso de sustancias con LMR establecido, la $CC\beta$ es la concentración a la que el método está en condiciones de detectar las muestras que exceden este LMR con una probabilidad estadística de $1 - \beta$ . Cuando se aplica al nivel de concentración más bajo que puede detectarse, la finalidad de este parámetro es proporcionar una información equivalente al límite de cuantificación (LC), pero la $CC\beta$ se asocia siempre con una probabilidad estadística especificada de detección y por ello se prefiere con respecto al LC.
<b>Resultado negativo falso</b>	Véase error beta.
<b>Resultado positivo falso</b>	Véase error alfa.

<b>Residuo no añadido</b>	Residuos de un analito que han entrado en una matriz por la vía prevista habitualmente para las trazas de la sustancia, en contraposición al enriquecimiento de muestras en el laboratorio.
<b>Método individual</b>	Método idóneo para determinar uno o más compuestos especificados. Se podría necesitar un método individual separado, por ejemplo, para determinar algunos metabolitos incluidos en la definición del residuo de un plaguicida o medicamento veterinario individual.
<b>Nivel calibrado más bajo (NCMB)</b>	La concentración más baja del analito detectada y medida en la calibración del sistema de detección. Puede expresarse como concentración de la solución en la muestra objeto del ensayo o como masa, y no debe incluir la contribución del testigo.
<b>Matriz</b>	Material o componente muestreado para estudios analíticos, excluido el analito.
<b>Matriz testigo</b>	Material de la muestra que no contiene concentraciones detectables de los analitos de interés.
<b>Curva de calibración patrón ajustada a la matriz (CCPAC)</b>	Curva de calibración patrón ajustada a la matriz (CCPAC) – una curva de calibración preparada añadiendo los patrones a los extractos de la muestra obtenidos de matrices testigo luego de la extracción.
<b>Método para una curva de calibración patrón ajustada a una matriz combinada (MCCPAMC)</b>	Método para una curva de calibración patrón ajustada a una matriz combinada (MCCPAMC), pero también es conocida como una curva de calibración patrón de una matriz robusta – una curva de calibración preparada añadiendo los patrones a una matriz testigo antes de la extracción.
<b>Método</b>	La serie de procedimientos aplicados desde la recepción de una muestra para su análisis hasta la producción del resultado final.
<b>Método de validación</b>	Proceso mediante el cual se verifica que el método es idóneo para la finalidad prevista.
<b>Método para residuos múltiples, MRM</b>	Método idóneo para identificar y cuantificar una gama de analitos, por lo general en diversas matrices diferentes.
<b>Resultado negativo</b>	Un resultado que indica que el analito no está presente en la concentración calibrada más baja o en una concentración superior (véase también Límite de detección).
<b>Verificación del funcionamiento</b>	Serie de datos de control de calidad generados durante el análisis de lotes de muestras para respaldar la validez de los análisis en curso. Los datos pueden emplearse para afinar los parámetros de funcionamiento del método.
<b>Resultado positivo</b>	Un resultado que indica la presencia del analito con una concentración igual o superior a la concentración calibrada más baja.
<b>Método cuantitativo</b>	Un método capaz de producir resultados, expresados como valores numéricos en unidades apropiadas, con exactitud y precisión que son idóneas para la finalidad prevista. El grado de precisión y veracidad debe ajustarse a los criterios especificados en la Tabla 1.
<b>Ensayo con solución testigo</b>	Análisis completo efectuado sin incluir materiales de la muestra para fines de control de calidad.
<b>Método de referencia</b>	Método analítico cuantitativo de fiabilidad probada que se caracteriza por tener veracidad, especificidad, precisión y capacidad de detección conocidas. Por lo general, estos métodos han sido objeto de estudios en colaboración, y suelen basarse en la espectrometría molecular. La condición de método de referencia es válida únicamente si el método se aplica dentro del régimen apropiado de garantía de la calidad.
<b>Procedimiento de referencia</b>	Procedimiento de eficacia establecida. Si no está disponible, podrá adoptarse como procedimiento de referencia un procedimiento que en teoría se considere sumamente eficaz y que sea fundamentalmente distinto del que es objeto del ensayo.
<b>Analito representativo</b>	Analito elegido para representar un grupo de analitos que probablemente tendrán un comportamiento similar al aplicar un método de análisis para residuos múltiples, tal como se deduce por sus propiedades fisicoquímicas como, por ejemplo, estructura, hidrosolubilidad, $K_{ow}$ , polaridad, volatilidad, estabilidad hidrolítica, pKa, etc.

<b>Analito representado</b>	Analito con propiedades fisicoquímicas que forman parte de la gama de propiedades de los analitos representativos.
<b>Producto representativo</b>	Un solo alimento o pienso utilizado para representar un grupo de productos a los efectos de la validación del método. Un producto podría considerarse representativo sobre la base de la composición inmediata de la muestra, por ejemplo, contenido de agua, grasa/aceite, ácido, azúcar y clorofila o por analogías biológicas de los tejidos, etc.
<b>Preparación de la muestra</b>	Procedimiento empleado, cuando es necesario, para convertir la muestra de laboratorio en una muestra analítica, eliminando aquellas partes (tierra, piedras, huesos, etc.) que no deben incluirse en el análisis.
<b>Procesamiento de la muestra</b>	El procedimiento o procedimientos (p. ej., cortar, triturar, mezclar) empleados para dar a la muestra analítica una homogeneidad aceptable con respecto a la distribución del analito antes de extraer la porción analítica. El componente de procesamiento en la preparación de la muestra deberá diseñarse de tal modo que se evite inducir cambios en la concentración del analito.
<b>Método de selección</b>	Método empleado para detectar la presencia de un analito o una clase de analitos en un nivel igual o superior a la concentración mínima de interés. Debe estar diseñado para evitar resultados negativos falsos en un nivel de probabilidad especificado (generalmente $\beta = 5\%$ ). Es posible que sea necesario confirmar los resultados cualitativos positivos mediante métodos de referencia o de confirmación. Véase Límite de adopción de decisiones y Capacidad de detección.
<b>Adición de solución estándar</b>	Un procedimiento mediante el cual se añaden cantidades conocidas del analito a fracciones de un extracto de la muestra que contiene el analito (para una concentración X medida inicialmente), a fin de producir nuevas concentraciones nominales (p. ej., 1.5X y 2X). Se miden las respuestas del analito producidas por las fracciones enriquecidas y el extracto original, y se determina la concentración del analito en el extracto original (adición nula de analitos) a partir de la pendiente y la intersección de la curva de la respuesta. Si la curva de la respuesta obtenida no es lineal, se requerirá cautela para interpretar el valor de X.
<b>Curva de calibración patrón (CCP)</b>	Una curva de calibración preparada usando patrones al no contar con una matriz, normalmente se denomina como "calibración externa".

**ABREVIATURAS**

CCRVDF	Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos	CL-EM/EM	Cromatografía líquida –Serie de espectrometría de masa
IQ	Ionización química	EMBR	Espectrometría de masa de baja resolución
EMIOQ	Espectrometría de masa con ionización química	MCCPAMC	Método para una curva de calibración patrón ajustada a una matriz combinada (robusta)
DUvF	Detectores Ultra violeta de fotodiodos	LMR	Límite máximo de residuos
DCE	Detector de captura de electrones	MRM	Método de residuos múltiples
IE	Ionización de electrones	EM	Espectrometría de masas
EMIE	Espectrometría de masa por ionización de electrones	CCPAC	Curva de calibración patrón ajustada a la matriz
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	DNF	Detector de Nitrógeno y Fósforo
DFP	Detector fotométrico de flama	$S_{y/x}$	Desviación estándar de las residuales calculada a partir de la función de calibración lineal
CG	Cromatografía de gases	CCP	Curva de calibración patrón

CG-EM	Cromatografía de grasas-Espectrometría de masa	CCF	Cromatografía en capa fina
CG-EM/EM	Cromatografía de gases-Serie de espectrometría de masa	DRUv	Detección de rayos ultravioleta
EMAR	Espectrometría de masa de alta resolución	OMS	Organización mundial de la salud
PI	Punto de identificación	Vis	Detección de luz visible
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios		
CL-EM	Cromatografía líquida-Espectrometría de masa		

**Anexo 2****DIRECTRICES GENERAL PARA LA PRESENTACIÓN DE COMENTARIOS**

Para facilitar la recopilación de los comentarios y preparar un documento útil con todos ellos, se solicita que los Miembros y Observadores, que aún no lo están haciendo, envíen sus comentarios bajo los siguientes títulos:

- (i) Comentarios generales
- (ii) Comentarios específicos

Los comentarios específicos deberían incluir una referencia a la sección y/o párrafo pertinente del documento para el que se hace el comentario.

Cuando se proponen cambios en párrafos específicos se solicita que, los miembros y observadores, proporcionen su propuesta de modificación acompañada por la justificación pertinente. El nuevo texto debería presentarse **subrayado/en negritas** y la eliminación de texto ~~tachando las palabras~~.

Para facilitar el trabajo de las Secretarías en la compilación de los comentarios, se le solicita a los Miembros y Observadores, que se abstengan de: usar texto a colores o sombreado, ya que los documentos se imprimen en blanco y negro; usar la herramienta de seguimiento de cambios (track change mode) el cual podría perderse al copiar y pegar los comentarios en el documento consolidado.

Para reducir el trabajo de traducción y ahorrar papel, se solicita que los Miembros y Observadores no imprimen el documento completo, sino solo aquellas secciones del texto en los que se proponen cambios y/o modificaciones.