



**PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS
COMITÉ DEL CODEX SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS Y TOMA DE MUESTRAS
38.^a reunión**

Budapest (Hungría), 8-12 de mayo de 2017

**CRITERIOS PARA LA APROBACIÓN DE MÉTODOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN
DE PRODUCTOS QUÍMICOS DE INTERÉS**

(Preparado por el GTe presidido por Chile y Francia)

ANTECEDENTES

El Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras (CCMAS), en su 35.^a reunión (marzo de 2014) aprobó los criterios para la determinación de sustancias análogas a las toxinas por métodos químicos en la Sección 1-8.6.1 de la Norma para los moluscos bivalvos vivos y los moluscos bivalvos crudos, así como la clasificación de los métodos AOAC 959.08 (bioensayo en ratones) y AOAC 2011.27 (ensayo de unión a receptor) como Tipo IV, en la Sección 1-8.6.2 de dicha Norma. (*Referencia a la nota 1 a pie de página: REP14/MAS, párrs. 23-25*). Durante el 37.^o período de sesiones de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) (julio de 2014), se examinaron los proyectos de secciones 1-8.6.1 y 1-8.6.2, enmendados y aprobados por el CCMAS. Asimismo, se manifestaron preocupaciones en lo referente a la clasificación del bioensayo en ratones como método del Tipo IV y se sugirió que no podía utilizarse para fines de control, inspección y reglamentación. Algunas delegaciones expresaron la opinión de que el CCMAS debería considerar la posibilidad de elaborar criterios para los métodos biológicos, ya que los criterios utilizados actualmente para la Sección de métodos eran aplicables a los métodos químicos y llevaba a que se clasificaran como métodos del Tipo IV. Tras haber debatido esta cuestión, la CAC devolvió la Sección 1-8.6.2 al CCMAS y le pidió que examinara la tipificación de los métodos en cuestión; alentó además al CCMAS a examinar sin demora la manera de abordar los métodos biológicos desde la perspectiva de un enfoque basado en criterios. (*Referencia a la nota 2 a pie de página: REP14/CAC párrs. 53-60*).

En la 36.^a reunión del CCMAS (febrero de 2015), se consideró la petición de la Comisión de revisar la tipificación de los métodos para determinar las biotoxinas marinas. Tras debatir ampliamente la cuestión sobre los tipos de métodos (biológicos y químicos) utilizados para cuantificar las toxinas marinas, el Comité acordó mantener la aprobación de los métodos de la Sección 1-8.6.2 como Tipo IV y convino en que el establecimiento de criterios para los métodos biológicos debería considerarse urgente, conforme también lo alentaba la Comisión. El CCMAS estableció un grupo de trabajo electrónico (GTe) dirigido por Chile y copresidido por Francia, con el siguiente mandato:

- i) clasificar los métodos biológicos según su naturaleza, principios, características, etc.;
- ii) identificar a qué clases de métodos se aplica el enfoque basado en criterios de métodos y recomendar criterios para la aprobación de cada clase de método biológico definida en el inciso i);
- iii) para los fines de este GTe, se consideraba que los métodos biológicos eran los métodos de análisis que utilizaban organismos o alguna de sus partes como indicadores analíticos, salvo los métodos PCR (reacción en cadena de la polimerasa), enzimáticos y ELISA (pruebas de inmunoabsorción enzimática).

Además, los métodos utilizados para la evaluación de la higiene alimentaria quedaban fuera del alcance del GTe, ya que eran competencia del Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos (CCFH). (*Referencia a la nota 3 a pie de página: REP15/MAS, párrs. 44-59*).

En la 37.^a reunión del CCMAS (febrero de 2016), las delegaciones de Chile y Francia presentaron el documento titulado "Discussion paper on criteria for endorsement of biological methods used to detect chemical of concern" (Documento de debate sobre los criterios para la aprobación de métodos biológicos utilizados para detectar productos químicos de interés) y explicaron que el GTe solo había abordado el primer punto de su mandato (la clasificación de los métodos). (*Referencia a la nota 4 a pie de página: CX/MAS 16/37/6*).

El GTe señaló que la mayor parte de los métodos biológicos tipificados en el Codex eran de Tipo II y III, con un método de Tipo I (el bioensayo en ratas para la determinación de la relación de eficiencia de las proteínas), en tanto que los métodos para la determinación de biotoxinas marinas eran de Tipo IV. Además, se señaló como un obstáculo el hecho de que no se hubiera revisado la lista de métodos de la norma CODEX STAN 234-1999 porque ya no había disposiciones para algunos de ellos, que podían ser retirados o bien examinados por el Comité (como los métodos para la minarina y la margarina, así como el uso actual de los métodos cromatográficos para la determinación de las vitaminas).

Durante la reunión se mantuvo un debate general y se celebraron consultas sobre la propuesta de actualizar la lista de métodos biológicos, en consulta con los comités pertinentes para determinar a qué tipo de métodos serían aplicables los criterios y evitar que se establecieran criterios para los métodos en general. A este respecto, algunos países sostuvieron que los métodos biológicos podían sustituirse por métodos basados en instrumentos, por lo que no sería necesario establecer criterios biológicos.

El Comité convino en volver a establecer el GTe presidido por Chile y copresidido por Francia, que trabajaría en inglés, para determinar los métodos que ya habían sido aprobados por el Codex y que podían sustituir a algunos de los métodos biológicos para la determinación de las vitaminas, e identificar cuestiones claras que podían plantearse a los comités pertinentes del Codex en relación con tales métodos; proseguir con la clasificación de los métodos biológicos; y determinar a qué clases de métodos se aplicaba el enfoque basado en criterios y recomendar criterios para respaldar cada clase de método biológico definida. (*Referencia a la nota 5 a pie de página: REP16/MAS, párrs. 64-70*).

El GTe contó con la participación de 18 países y una organización (la lista de participantes se adjunta como Apéndice I).

El GTe ha preparado una lista modificada de los métodos biológicos (Parte I) y los métodos biológicos y sus criterios de validación (Parte II), que figuran en este documento.

Recomendación

Se invita al Comité a examinar la lista modificada de métodos biológicos (Parte I) y los métodos biológicos y sus criterios de validación (Parte II).

PARTE I

INTRODUCCIÓN

El GTe comenzó su labor examinando el último apartado del párrafo 64 del documento REP16/MAS:

“Por tanto, se propuso revisar la lista y no definir criterios para los métodos que pudieran ser eliminados de esta. Podría plantearse pues una propuesta para que los comités del Codex pertinentes examinaran los métodos e informaran al CCMAS acerca de si seguían queriendo conservar los métodos biológicos.”

Así, a partir de la lista más reciente de la norma CODEX STAN 234-1999 (con las enmiendas aprobadas en el 39.º período de sesiones de la Comisión del Codex Alimentarius en 2016), se modificó la lista de métodos biológicos propuesta en la última reunión del CCMAS.

Se añadieron dos columnas, una sobre la “propuesta de suprimir o cambiar el tipo de método” y otra sobre el “posible método propuesto”.

Se tuvo en cuenta que los métodos utilizados para cuantificar las vitaminas mediante la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) habían mejorado considerablemente en los últimos 20 años y que prácticamente habían sustituido a todos los antiguos métodos microbiológicos.

Algunos métodos microbiológicos todavía pueden considerarse útiles para la cuantificación de la vitamina B12, los folatos y el ácido pantoténico en los alimentos. Pero en los próximos años, la cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (CL-EM) debería conducir a la supresión o modificación del tipo de métodos microbiológicos.

Recomendación

El GTe propone la siguiente lista modificada de métodos biológicos:

DETERMINACIÓN DE LA FERMENTABILIDAD

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Zumos (jugos) y néctares de fruta	Determinación de la fermentabilidad	IFUMA 18	Método microbiológico	I	No	-----

ÁCIDO FÓLICO

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Alimentos especiales	Ácido fólico	AOAC 944.12	Ensayo microbiológico	II	No	-----
Preparados para lactantes	Ácido fólico	AOAC 992.05 (Mide el ácido fólico libre más los folatos libres sin combinar presentes de forma natural, agregados y medidos como ácido fólico) EN 14131 (Folato total [libre más combinado], agregado y medido como ácido fólico)	Ensayo microbiológico	II	No	-----

VITAMINA B3: NICOTINAMIDA

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Alimentos especiales	Nicotinamida para alimentos a base de leche	AOAC 944.13	Ensayo microbiológico	II	Sí (III)	Método HPLC como EN 15652 (Tipo II)

VITAMINA B3: NIACINA

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Preparados para lactantes	Niacina	AOAC 985.34 (Niacina [preformada] y nicotinamida)	Ensayo microbiológico y turbidimetría	III	No	Método HPLC como EN 15652 (Tipo II)

VITAMINA B5: ÁCIDO PANTOTÉNICO

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Alimentos especiales	Ácido pantoténico/alimentos enriquecidos	AOAC 945.74	Ensayo microbiológico	II	No	-----
Alimentos especiales	Ácido pantoténico/alimentos no enriquecidos	The Analyst 89 (1964): 1, 3-6, ibid. 232 US DeptAgr., Agr. Handbook 97 (1956)	Ensayo microbiológico	IV	No	-----
Preparados de continuación	Ácido pantoténico	AOAC 992.07 Mide el pantotenato total: ácido pantoténico libre más formas combinadas	Ensayo microbiológico	II	II o III	AOAC 2012.16/ISO 20639 UHPLC MS/MS (Tipo I o II)

VITAMINA B6: PIRIDOXINA

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Preparados para lactantes	Vitamina B6	AOAC 985.32	Ensayo microbiológico	III	---	HPLC-fluorescencia como AOAC 2004.07 o EN 14164 (Tipo II)
Preparados para lactantes	Vitamina B6	CEN 14166 (Agrega piridoxal, piridoxina y piridoxamina libres y combinados, y se mide como piridoxina)	Ensayo microbiológico	III	----	HPLC-fluorescencia como AOAC 2004.07 o EN 14164 (Tipo II)
Alimentos especiales	Vitamina B6	AOAC 961.15	Ensayo microbiológico	II	Tipo III	HPLC-fluorescencia como AOAC 2004.07 o EN 14164 (Tipo II) y EN 14663 (incluye las formas glicosiladas) (formas libres y combinadas fosforiladas y glicosiladas medidas como las formas individuales piridoxal, piridoxina y piridoxamina), método fluorométrico HPLC (Tipo III)

VITAMINA B12: COBALAMINA

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Alimentos especiales	Vitamina B12	AOAC 952.20	Ensayo microbiológico	II	Tipo III	HPLC-UV AOAC 2011.10 / ISO 20634 (Tipo II)
Preparados lácteos para lactantes	Vitamina B12	AOAC 986.23	Bioensayo-Turbidimétrico	II	Tipo III	HPLC UV AOAC 2011.10 / ISO 20634 (Tipo II)

VITAMINA D: ERGOCALCIFEROL (D2) y colecalciferol (D3), OTROS MÉTODOS

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Margarina	Vitamina D	AOAC 936.14	Bioensayo	II	Sí (Tipo III o II)	Método HPLC como EN 12821 (Tipo II o III) AOAC 992.26 (D3) para HPLC-UV Tipo III AOAC 995.05 (D2&D3) para HPLC-UV (Tipo III)
Alimentos especiales	Vitamina D	AOAC 936.14	Bioensayo en ratas	IV	----	Método HPLC como EN 12821 (Tipo II)
Preparado para lactantes a base de leche	Vitamina D2 y vitamina D3	-----	----	----	-----	La referencia temporal ISO/CD/20636 debería ser muy pronto "método del Tipo II" (método de cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas [UPLC/MS/MS])

BIOTOXINAS MARINAS

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Posible método propuesto
Moluscos bivalvos vivos y moluscos bivalvos crudos	Toxicidad parálitica de los moluscos	AOAC 959.08	Bioensayo en ratones	IV	III*	-----

Nota 1: Los métodos del Tipo III son los que satisfacen todos los criterios exigidos por el Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras para los métodos que pueden emplearse para fines de control, inspección o reglamentación. En el caso de este método, cabe señalar que cumple ciertos requisitos, si se deja como Tipo IV significaría que no cumplía ningún requisito. Ambos métodos son objeto de validación de intercomparación (AOAC), lo que permite posteriormente su utilización satisfactoria como métodos biológicos para fines de control.

Nota 2: el documento técnico FAO/OMS titulado "Toxicity Equivalency Factors for Marine Biotoxins Associated with Bivalve Molluscs" (Factores de equivalencia tóxica para las biotoxinas marinas asociadas con los moluscos bivalvos) 2016 (<http://www.fao.org/3/a-i5970e.pdf>) y, en este documento técnico, el Cuadro 5.1, "TEFs Recommended for each Biotxin Group by the Expert Group" (Factores de equivalencia tóxica recomendados por el Grupo de expertos para cada grupo de biotoxinas) brinda una orientación más específica sobre el modo de aplicar los factores de equivalencia tóxica para calcular la potencia total de una determinada muestra (páginas 66-70); esta información permitirá citar los métodos del Cuadro 1 (determinación de sustancias análogas a las toxinas por métodos químicos - métodos aplicables que cumplen los criterios) de la norma CODEX STAN 234-1999 (páginas 16-17) como "posibles métodos propuestos" para las disposiciones sobre la "parálisis tóxica producida por los moluscos bivalvos".

* Varios países proponen que se cambie el método por uno de Tipo II porque el bioensayo en ratones cuenta con parámetros de exactitud y precisión, límites de detección (LD) y estudios de intercomparación. Por consiguiente, con arreglo a la tipificación de los métodos del CCMAS, no sería un método de Tipo IV.

REP

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo	Se propone que se suprima o cambie	Método posible propuesto
Alimentos especiales	Relación de eficiencia de las proteínas (REP)	AOAC 960.48	Bioensayo en ratas	I	No	-----

MÉTODOS BIOLÓGICOS Y SUS CRITERIOS DE VALIDACIÓN

Bioensayo: método en el que la potencia de una sustancia se mide a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivos (tales como los instrumentos de análisis basados en células, receptores o el inmunoensayo).

Clasificación de los bioensayos en función de su tipología:

- Los **bioensayos cualitativos** son aquellos que no generan una respuesta gradual medible, con lo que se obtiene una respuesta absoluta de la unidad sometida a ensayo. El bioensayo ofrece una respuesta negativa o positiva según un umbral de concentración específico.
- Los **bioensayos cuantitativos** ofrecen una respuesta gradual que genera un valor numérico.

ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA VALIDACIÓN DE LOS BIOENSAYOS

El objetivo de la validación de un bioensayo es confirmar las características operativas del procedimiento para su uso previsto. Pueden incluirse en un mismo bioensayo múltiples diluciones (concentraciones) de una o más muestras de ensayo y la muestra de referencia.

A efectos del presente documento, estas diluciones se denominan “conjuntos de muestras repetidas”, que contienen un solo tipo de organismo, por ejemplo, un grupo de animales o células de un vaso, en cada una de las diluciones de cada muestra (de ensayo y de referencia).

En la práctica, un proceso se basa a menudo en el trabajo realizado por un único analista en un laboratorio, con una serie de equipos, en un breve período de tiempo (normalmente un día). Por “ensayo” se entiende el conjunto de datos utilizados para apreciar la similitud y estimar la potencia de cada muestra de ensayo respecto a la muestra de referencia.

TÉRMINOLOGÍA

Actividad biológica: habilidad o capacidad específica del producto de lograr un efecto biológico definido.

Coefficiente de variación (%): desviación estándar relativa. El coeficiente de variación es la relación entre la desviación estándar y la media, multiplicado por 100 y expresado como porcentaje. Por ejemplo, un coeficiente de variación de 20 % equivale a una desviación estándar de 0,2 respecto a la media.

Desviación estándar geométrica (%): desviación estándar geométrica: variabilidad de los valores de transformación logarítmica de una respuesta logarítmica normal expresada como porcentaje en la escala no transformada. Figura como $\text{antilog}(S)$, donde S es la desviación estándar determinada en la escala logarítmica.

Especificidad: en el caso de productos o componentes asociados a matrices complejas, la especificidad (denominada a veces “selectividad”) consiste en demostrar la falta de interferencia atribuible a los elementos de la matriz o elementos relacionados con los productos que podrían estar presentes. Puede evaluarse mediante una dilución paralela de la muestra de referencia a la que se le añade o no el compuesto que podría interferir.

Exactitud (de un método de análisis): grado de concordancia de las distintas mediciones de un analito cuando el procedimiento se aplica repetidas veces a múltiples partes alícuotas homogéneas.

La precisión debería medirse utilizando cinco determinaciones por concentración como mínimo. Se recomienda utilizar tres concentraciones, como mínimo, en el intervalo previsto de concentraciones de las muestras objeto de estudio. El grado de precisión determinado en cada nivel de concentración no debería ser superior al 15 % del coeficiente de variación, salvo en el caso del límite mínimo de cuantificación, en que no debería ser superior al 20 % del coeficiente de variación. La exactitud se subdivide asimismo en la precisión (exactitud) o repetibilidad entre diferentes lotes de un mismo proceso —que evalúa la precisión durante un mismo proceso de análisis— y la precisión o repetibilidad entre lotes de diferentes procesos —que mide la precisión en función del tiempo y puede recurrir a diferentes analistas, equipos, reactivos y laboratorios—.

Deberían diluirse las concentraciones de las muestras que excedan el límite superior de la curva estándar. La exactitud y precisión de estas muestras diluidas debería demostrarse en la validación del método.

Factor de conversión: expresa las unidades de μg del equivalente tóxico por unidad ratón.

Factor de conversión = concentración de saxitoxina (STX) ($\mu\text{g}/\text{ml}$) / unidad ratón (corregida)

Incertidumbre: estimación que caracteriza el rango de valores en el que se halla el valor convencional real de la magnitud medida.

Límite de cuantificación (LC): concentración más baja del analito que puede determinarse con un nivel aceptable de incertidumbre. Debe determinarse a partir de una medición estándar o una muestra apropiada, que se corresponde en general con el punto más bajo de la curva de calibración (excluidas las muestras testigo). No debe obtenerse por extrapolación. *En cuanto al método bioanalítico, se demostrará que el nivel de notificación es diferente de las muestras testigo, por un factor como mínimo de tres, con un resultado inferior al rango de medición. Por lo tanto, dicho nivel debe calcularse a partir de muestras que contengan los compuestos seleccionados en torno al nivel mínimo requerido, y no a partir de una relación señal/ruido ni de una muestra testigo.*

Límite de detección (LD): concentración más baja de un analito en que el método bioanalítico permite diferenciar de forma fiable el ruido de fondo.

Linealidad: capacidad de una prueba de generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito de la muestra. Se obtiene de la preparación de triplicados e, independientemente, de muestras testigo o muestras adicionales de ciertas sustancias a cinco niveles de concentración diferentes, como mínimo, para la disposición en cuestión. Establecer en la medida de lo posible el rango de concentración adecuado, teniendo en cuenta el valor de la especificación en el medio de ese intervalo o calculando la media de los niveles de la curva de calibración. Analizar las muestras preparadas usando el método elegido y determinar los resultados del analito para cada nivel de concentración.

Matriz biológica: material discreto de origen biológico del que pueden tomarse muestras y que puede tratarse de una forma que pueda reproducirse.

Potencia: medida de la actividad biológica utilizando un ensayo biológico cuantitativo apropiado (también denominado “ensayo de potencia” o “bioensayo”) sobre la base del atributo del producto relacionado con las propiedades biológicas pertinentes. La potencia es la medida cuantitativa de la actividad biológica.

Precisión relativa (sesgo relativo): la “precisión relativa” de un bioensayo de potencia relativo es la relación entre la potencia relativa medida y la potencia relativa conocida. La “precisión relativa” de un bioensayo se refiere a una pendiente unitaria entre la potencia relativa medida por el método logarítmico y el nivel expresado en forma de logaritmo, cuando se conozca. El sesgo relativo a los diferentes niveles se calcula como sigue: :

A partir de los datos obtenidos en la prueba de linealidad y los resultados del análisis, calcular la cantidad de vitaminas para cada uno de los niveles. Calcular el porcentaje de recuperación mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Recovery} = \frac{C_f}{C_a} * 100$$

donde:

C_f = concentración de vitamina recuperada en la muestra testigo o muestra adicional.

C_a = concentración de vitaminas añadidas a la muestra objeto de análisis.

Calcular la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa de cada uno de los valores de recuperación para cada nivel de concentración de vitaminas.

Verificar que todos los niveles de concentración cumplen los criterios de aceptación para la recuperación y la repetibilidad.

Representar los datos de concentración obtenidos (en el eje de ordenadas) en función de la concentración (en el eje de abscisas).

Calcular el coeficiente de correlación.

Indicar el grado de correspondencia del rango de funcionamiento con las unidades de concentración que el método haya permitido establecer.

Rango de funcionamiento: escala de análisis de validación del bioensayo, donde los datos se corresponden con las potencias relativas de las muestras utilizadas en el estudio de validación.

Recuperación: fracción o porcentaje del analito recuperado cuando la muestra se haya sometido a todo el proceso. Con los datos de recuperación obtenidos durante la determinación del rango de funcionamiento, determinar el porcentaje de recuperación y el intervalo de confianza. Indicar el porcentaje de recuperación y el intervalo de confianza.

Repetibilidad: precisión obtenida en condiciones de observación en que los resultados independientes de un ensayo se obtienen mediante la aplicación del mismo método por el mismo operador a elementos de ensayo idénticos y en el mismo laboratorio, utilizando el mismo equipo a breves intervalos de tiempo.

Representación gráfica lineal: representación gráfica de los resultados del análisis (eje de ordenadas) en función de cada uno de los valores de concentración (eje de abscisas). Permite verificar visualmente la linealidad de los datos y el coeficiente de determinación (R^2) que debería ser superior a 0,7.

Representación gráfica residual: se obtiene calculando la pendiente (m) y la ordenada en el origen (b), que determinan el valor del resultado del análisis ajustado (y') para cada nivel de concentración mediante la siguiente ecuación:

$$y' = mx + b$$

Calcular la variación residual de los valores (yy'), es decir, la diferencia entre el resultado del análisis obtenido (y) y el que ha sido calculado utilizando la curva ajustada (y') para cada nivel de concentración.

Representar el valor residual (en las ordenadas) en función de la concentración correspondiente (en las abscisas). Observar la dispersión de los datos.

Indicar el grado de correspondencia del rango lineal con las unidades de concentración que el método haya permitido establecer.

Reproducibilidad: precisión obtenida en condiciones de observación en las que se obtienen resultados independientes de un ensayo aplicando el mismo método a elementos de ensayo idénticos en diferentes laboratorios, con distintos operadores y utilizando equipos diferentes.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO PERTINENTES DE LOS MÉTODOS DE BIOENSAYO PARA DETERMINAR LA VALIDACIÓN

Criterios de LOS métodos biológicos en función de los analitos

Parámetro	Para los métodos actualmente oficiales del Codex		
	Vitaminas	Biotoxinas marinas Toxinas de los moluscos que provocan parálisis	REP
Especificidad	Ausencia del analito en una matriz libre del mismo tipo. Ausencia del analito en una matriz libre del mismo tipo Prueba de que la sustancia cuantificada es el analito buscado. Cada analito se ensaya para garantizar que no haya interferencias.	Ausencia del analito en una matriz libre del mismo tipo y posible presencia de sustancias que pueden interferir.	Ausencia del analito en una matriz libre del mismo tipo y posible presencia de sustancias que pueden interferir.
Rango de funcionamiento:	Linealidad Como mínimo, cuatro niveles Coeficiente de correlación > 0,97 y distribución aleatoria de puntos en torno a la línea. Rango El coeficiente de correlación es superior a 0,97 en el gráfico lo que representa la concentración recuperada en función de la concentración añadida.	(Un país propone que el rango seleccionado para los ensayos en ratones se corresponda con una muerte en cinco o siete minutos, lo que podría convertirse en equivalentes STX).	-----
Recuperación	70-130 %	70-130 %	-----
Sesgo relativo	≤ 10 %	≤ 10 %	≤ 10 %
Límites	LD < LC < LMP	≤40 µg STX diHCl eq/100g	-----
Repetibilidad RSD_r %	≤25 %	-----	-----
Exactitud intermedia RSD_R %	≤30 %	≤50 %	-----
Parámetro toxicológico	CPk TEQ TEF	CF: los valores CF determinados en controles rutinarios deben corresponderse con la media del CF a ± 20%. TEQ TEF	TEQ

Referencia bibliográfica:

- 1 Documento técnico. Toxicity Equivalency Factors for Marine Biotoxins Associated with Bivalve Molluscs. FAO/OMS. 2016.
- 2 Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 20.^a edición (2016).
- 3 Campos-Giménez *et al.* Determination of vitamin B12 in infant formula and adult nutritionals by liquid Chromatography/UV Detection with Immunoaffinity Extraction: First Action 2011.08. Journal of AOAC International Vol. 95 , N.º 2, 2012.
- 4 Stevens y Dowell. Determination of Vitamins D2 and D3 in Infant Formula and Adult Nutritionals by Ultra-Pressure Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection (UPLC-MS/MS): First Action 2011.12. Journal of AOAC International, Vol. 95, N° 3, 2012.
- 5 Staffas y Nyman. Determination of Cholecalciferol (Vitamin D3) in Selected Foods by Liquid Chromatography NMKL Collaborative Study. Journal of AOAC International , Vol. 86, N.º 2, 2003.
- 6 Determination of Vitamin D in foods: Current Knowledge and data gaps MPI technical paper N°. 2014/03. Ministerio de Agricultura y Actividades Forestales, en el marco del Proyecto NUT/09/01, "Science Programme Reporting", como parte del contrato general de servicios científicos. Ministerio de Industrias Primarias, Manatū Ahu Matua.
- 7 Bishnoi K *et al.* Microbiological Assay for Vitamin B. International Research Journal of Pharmacy, 3 (2), 2012.
- 8 Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, Departamento de los Estados Unidos de Salud y Servicios Sociales, Administración de Alimentos y Medicamentos, Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER), Centro de Medicamentos Veterinarios (CVM), mayo de 2001.
- 9 The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Segunda edición, 2014. EURACHEN.
- 10 Reglamento (UE) n.º 589/2014 de la Comisión de 2 de junio de 2014 por el que se establecen métodos de muestreo y de análisis para el control de los niveles de dioxinas, PCB similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas en determinados productos alimenticios y por el que se deroga el Reglamento (UE) n.º 252/2012.
- 11 Establishing Acceptance Criteria for Analytical Methods Knowing how method performance impacts out-of-specification rates may improve quality risk management and product knowledge. Analytical Best Practices.
- 12 ICH Harmonised tripartite guideline specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products Q6B. Conferencia internacional sobre la armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano. 1999.
- 13 Appendix k: guidelines for dietary supplements and botanicals. Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC).
- 14 Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. Por Ghulam A. Shabir.
- 15 TG455: draft performance-based test guideline for stably transfected transactivation in vitro assays to detect estrogen receptor agonist and antagonists. OECD/OCDE guideline for testing of chemicals. 2016.
- 16 Nota: Versión aprobada por la Asamblea Mundial de Delegados de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en mayo de 2013. OIE *Terrestrial Manual* 2013 1 Capítulo 1.1.5. Principles And Methods Of Validation Of Diagnostic Assays For Infectious Diseases.
- 17 OECD Guideline For The Testing Of Chemicals. The Hershberger Bioassay in Rats.
- 18 Peter A. Behnisch *et al.* Harmonised Quality Criteria For Chemical And Bioassays. Analyses Of PCDDs/PCDFs In Feed And Food. Part 2: General Considerations, Bioassay Methods.
- 19 AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals.

APÉNDICE I

LISTA DE PARTICIPANTES

PRESIDENTES DEL GTE

PAÍS	NOMBRE	INSTITUTO	CORREO ELECTRÓNICO:
Chile	Sandoval Soraya	Instituto de Salud Pública de Chile Laboratorio de Metrología de Referencia.	soraya@ispch.cl
Francia	Deborde Jean-Luc	SCL (Le service commun des laboratoires) - Ministry of Economy and Finance	jean-luc.deborde@scl.finances.gouv.fr

PARTICIPANTES

PAÍS	NOMBRE	INSTITUTO	CORREO ELECTRÓNICO:
Australia	Coghlan Richard	National Measurement Institute - Department of Industry, Innovation and Science	richard.coghlan@measurement.gov.au
Brasil	Lindner Schreiner Ligia	Experta en reglamentación sanitaria. Brazilian Health Regulatory Agency	ligia.schreiner@anvisa.gov.br
Canadá	Lee Barbara	Bureau of Chemical Safety. Health Products and Food Branch. Health Canada	barbara.lee@hc-sc.gc.ca codex_canada@hc-sc.gc.ca
	Rawn Thea	Bureau of Chemical Safety, Health Products and Food Branch, Health Canada	thea.rawn@hc-sc.gc.ca
	Tittlemier Sheryl	Canadian Grain Commission	sheryl.tittlemier@grainscanada.gc.ca
	Van de Riet Jeffrey	Canadian Food Inspection Agency	jeffrey.vandenriet@inspection.gc.ca
Chile	Cáceres Catherine	Instituto de Salud Pública de Chile	ccaceres@ispch.cl
	Rojas Sergio	Servicio Agrícola Ganadero (SAG)	sergio.rojas@sag.gob.cl
	Núñez Vanessa	Servicio Agrícola Ganadero (SAG)	vanessa.nunez@sag.gob.cl
	Zamora Claudia	Servicio Agrícola Ganadero (SAG)	claudia.zamora@sag.gob.cl
	Donders Mauricio	Universidad Tecnológica Metropolitana de Chile	mdonders@utem.cl
Ecuador	Villagómez Tene Erika Sofía	Secretaría de Educación Superior, Ciencia y Tecnología (SENESCYT)	evillagomez@senescyt.gob.ec
Estados Unidos de América	Noonan Gregory	Division of Analytical Chemistry Center for Food Safety and Applied Nutrition US Food and Drug Administration	gregory.noonan@fda.hhs.gov
	Norden Timothy	Technology & Science Division Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration US Department of Agriculture	timothy.d.norden@usda.gov
	Gray Patrick	Chemical Contaminants Branch Center for Food Safety and Applied Nutrition U.S. Food and Drug Administration	patrick.gray@fda.hhs.gov

	Maratos	María	US Codex Office Food Safety and Inspection Service US Department of Agriculture	marie.maratos@fsis.usda.gov
Francia	Deborde	Jean-Luc	SCL (Le service commun des laboratoires) - Ministry of Economy and Finance	jean-luc.deborde@scl.finances.gouv.fr
Grecia	Katikou	Panagiota	Directorate of Veterinary Centre of Thessaloniki Department of Aquatic Organisms Pathology, Control of Marine Biotoxins and Toxins in Other Waters. National Reference Laboratory for Marine Biotoxins Ministry of Rural Development and Food	pkatikou@otenet.gr
Hungría	Attila	Nagy	Nebih- Nemzeti Élelmiszerlánc- biztonsági Hivatal Élelmiszer- és Takarmánybiztonsági Igazgatóság	nagyattila@nebih.gov.hu
India	Sharma	DK	National Dairy Development Board (NDDB)	dksharma@nddb.coop drdksharma224@gmail.com
	Geetanjali		Central Food Laboratory, Kolkata	geetanjali.sharma.cfl@gmail.com
	Sabeerali	A.M	Export Inspection Council of India (EIC)	
	Brahmbhatt	Viral	Federation of Indian Chambers of Commerce and Industry (FICCI)	viral.brahmbhatt@rd.nestle.com
Japón	Watanabe	Takahiro	Division of Foods, National Institute of Health Sciences	takanori_ukena@nm.maff.go.jp
	Kobayashi	Hidetaka	Plant Products Safety Division, Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries	codex_maff@nm.maff.go.jp
México	Vega Rodríguez	Guillermo	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura / Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)	gvega@cofepris.gob.mx
	Gálvez González	César Omar	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura / Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS)	cgalvez@cofepris.gob.mx
Nueva Zelandia	Morris	Susan	Chemical & Microbiological Assn. Regulation & Assurance. Ministry for Primary Industries	susan.morris@mpi.govt.nz
Países Bajos	Behnisch	Peter	BioDetection Systems BV	peter.behnisch@bds.nl
	Van der Schee	Henk	Dutch Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA)	henk.van.der.schee@vwa.nl

Polonia	Hać-Szymańczuk	Elżbieta	Warsaw University of Life Sciences Department of Biotechnology, Microbiology and Food Evaluation Division of Food Biotechnology and Microbiology	elzbieta_hac_szymanczuk@sggw.pl
República de Corea	Chae Hyung	Kim	Food Standard Division, Ministry of the Food and Drug Safety (MFDS)	wonya8282@korea.kr codexkorea@korea.kr
Senegal	Ndiay	Astou	Chemistry Section/ National Control Laboratory	maguidadou@yahoo.fr codexsenegal@sante.gouv.sn
	Beye Sarre	Fatou	Microbiology Section/National Control Laboratory	fatoube@yahoo.fr
Unión Europea	Caricato	Paolo	Comisión Europea	sante-codex@ec.europa.eu
Uruguay	Salhi	Maria	Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA). Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP).	msalhi@dinara.gub.uy
	Flores	Laura	Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU)	lflores@latu.org.uy