

Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles

ANTEPROYECTO

Advertencia

Este documento no es una Norma Nacional NORDOM. Se distribuye para su revisión y comentarios. Está sujeto a cambios sin previo aviso y no puede ser referido como un Estándar Internacional.

Los destinatarios de este borrador están invitados a enviar, con sus comentarios, la notificación de cualquier derecho de patente relevante del que tengan conocimiento y proporcionar documentación de respaldo.

Contenido

Prefacio	iii
0 Introducción.....	v
1 Objeto y campo de aplicación.....	1
1.1 Objeto.....	1
1.2 Campo de aplicación.....	1
2 Referencias normativas.....	1
3 Términos y definiciones.....	1
4 Estimación del período de retiro	5
4.1 Modelo estadístico.....	5
4.1.1 Base de datos	5
4.1.2 Supuestos del análisis de regresión lineal	6
4.1.3 Procedimiento estadístico basado en el LMR.....	7
4.1.4 Procedimiento alternativo basado en el LMR.....	8
4.2 Tiempo de retiro estimado a partir de los residuos en el sitio de inyección.....	8
4.2.1 Interpretación	9
4.2.2 Principios generales.....	9
4.2.3 Diseño del estudio y toma de muestras.....	9
4.2.4 Procedimiento	10
4.3 Esquema comparativo de muestreo y análisis de los tejidos comestibles y estimación del período de retiro mediante el procedimiento basado en el LMR.....	11
Anexo A Procedimientos estadísticos	12
A.1 Test de Bartlett.....	12
A.2 Test de Hartley.....	12
A.3 Test de Cochran.....	13
A.4 Test de Shapiro-Wilk.....	14
A.5 Cálculo del límite superior del intervalo de tolerancia	15
A.6 Método de distribución de t no centralizada (FDA)	15
A.7 Método de Stange (EMEA).....	16
Bibliografía	17

Prefacio

El Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL), es el organismo oficial que tiene a su cargo el estudio y preparación de las Normas Dominicanas (NORDOM) a nivel nacional. Es miembro de la Organización Internacional de Normalización (ISO), Comisión Internacional de Electrotécnica (IEC), Comisión del Codex Alimentarius, Comisión Panamericana de Normas Técnicas (COPANT), representando a la República Dominicana ante estos Organismos.

La norma **NORDOM 65-1:006 Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles** ha sido preparada por la Dirección de Normalización del Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL).

La decisión de desarrollar esta norma fue motivada por requerimiento del Departamento de Registro de Establecimientos y Productos Veterinarios de la Dirección General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, ante la necesidad de contar con una norma nacional que establezca la guía para el cálculo del período de retiro de los medicamentos veterinarios, en la producción primaria de alimentos de origen animal.

El estudio de la citada norma estuvo a cargo del **Comité Técnico 65-1 Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos**, integrado por representantes de los sectores de producción, consumo y técnico, quienes iniciaron su trabajo tomando como base la norma **Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles** de la Representación Regional de la OIE para las Américas, **Segunda revisión, 2013**, de la cual partió la propuesta de norma a ser estudiada en el comité.

Dicha propuesta de norma fue aprobada como anteproyecto de norma por el comité técnico de trabajo, en la reunión **No. 34** de fecha **21 de junio de 2022** y enviada a encuesta pública, por un período de 60 días.

Formaron parte del comité técnico, las entidades y personas naturales siguientes:

PARTICIPANTES:

Bianka Socías
Pedro Pablo De Marchena
Belinda Bodden

Virginia Quiñones

Francelyn Pérez

Ricardo Méndez Mir

Tomis Encarnación
Fidel Del Rosario

José Luis Soto

REPRESENTANTES DE:

Departamento de Registro de Establecimientos y Productos Veterinarios / Dirección General de Ganadería (DIGEGA)/ Ministerio de Agricultura (MA)

División de Normas y Análisis de Riesgos /Departamento de Cuarentena Animal/ Dirección General de Ganadería (DIGEGA)/ Ministerio de Agricultura (MA)

Departamento de Inocuidad Alimentaria (DIA) / Ministerio de Agricultura

Asociación de Fabricantes, Importadores y Representantes de Productos Veterinarios y Afines, Inc. (AFIRPROVA)

Instituto Nacional de Protección de los Derechos del Consumidor (PRO CONSUMIDOR)

Departamento de Regulación de Mercado y Coherencia Normativa / Ministerio de Industria, Comercio y Mipymes (MICM)

Svetlana Afanasieva

División de Nutrición / Viceministerio de Salud
Colectiva / Ministerio de Salud Pública (MISPAS)

Luis Martínez Polanco
Pedro De Padua

Departamento de Alimentos / Dirección General
de Medicamentos, Alimentos y Productos
Sanitarios (DIGEMAPS) / Ministerio de Salud
Pública (MISPAS)

Modesto Pérez

Punto de Contacto Codex en RD (PCC-RD) /
Ministerio de Salud Pública (MISPAS)

Carmen Brito

Instituto Dominicano para la Calidad (INDOCAL)

0 Introducción

0.1 La seguridad del consumidor necesita ser resguardada mediante la valoración de todas las sustancias farmacológicamente activas destinadas a ser usadas en animales productores de alimentos. Los períodos de retiro son determinados con el objeto de asegurar que los residuos de dichas sustancias en los tejidos comestibles disminuyan hasta concentraciones permitidas.

0.2 Mientras que el límite máximo de residuos (LMR) para un determinado tejido se aplica para el principio activo en sí mismo, el período de retiro se fija de manera individual para cada medicamento veterinario como parte del proceso de autorización de comercialización.

0.3 El principio activo incluido en el medicamento veterinario que se administra a los animales para la producción de alimentos no necesariamente es la sustancia que estará presente en los productos comestibles. Los sistemas enzimáticos o fluidos fisiológicos de un animal, pueden actuar sobre dicho principio activo administrado y producir nuevas sustancias tales como metabolitos que pueden ser tanto o más nocivos para el consumidor que el principio activo original. La concentración de estas sustancias en los productos comestibles de origen animal estará en función de la velocidad y el grado de absorción del agente farmacológico original, la velocidad del metabolismo y la tasa de excreción tanto del principio activo original como de sus metabolitos. Por lo tanto, el residuo total del agente farmacológico administrado en los animales tratados se compondrá del principio activo original, metabolitos libres y metabolitos que están unidos a moléculas endógenas.

0.4 Debido a que los diferentes componentes de los residuos totales pueden diferir en sus potenciales toxicológicos, es que se deberá proporcionar información sobre la naturaleza química, la cantidad y la persistencia de los residuos totales en los tejidos comestibles de los animales que han sido objeto del tratamiento.

0.5 La forma más simple y práctica de determinar el período de retiro ha sido la de identificar el momento en que en todos los tejidos monitoreados de todos los animales experimentales, las concentraciones se ubican por debajo del LMR. En algunos casos y, cuando hay una variabilidad marcada entre los datos de eliminación, se suele agregar un período de tiempo como factor de seguridad.

0.6 Esta guía es una recomendación para el cálculo de períodos de retiro en un intento de armonizar la metodología utilizada internacionalmente para estos fines. También pone énfasis en la determinación del tiempo de retiro por el método estadístico basado en el límite máximo de residuos (LMR), el cual es considerado de primera elección.

0.7 La elección del método estadístico a utilizar es responsabilidad del solicitante, en cualquier caso, deberá estar debidamente justificado con documentos adecuados.

0.8 En esta guía se describen los procedimientos estandarizados para poder establecer el período de retiro apropiado para cada principio activo asociado a una forma farmacéutica, dosis y vía de administración propuesta para una determinada especie animal, a fin de garantizar la seguridad del consumidor.

Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles

1 Objeto y campo de aplicación

1.1 Objeto

Este documento establece una guía para el cálculo de períodos de retiro adecuados para tejidos comestibles provenientes de animales productores de alimentos cuando a estos se les aplica un medicamento veterinario determinado.

1.2 Campo de aplicación

1.2.1 Este documento es aplicable a tejidos comestibles provenientes de animales productores de alimentos cuando a estos se les aplica un medicamento veterinario determinado.

1.2.2 Este documento no se aplica al cálculo de períodos de retiro en otros productos de origen animal como son leche, huevos, miel y productos de acuicultura, los cuales requieren una consideración diferente.

2 Referencias normativas

Los siguientes documentos se mencionan en el texto de tal manera que parte o todo su contenido constituyen requisitos de este documento. Para las referencias con fecha, sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha, se aplica la última edición del documento referenciado (incluidas las enmiendas).

Owen, D.B., *Handbook of Statistical Tables*, Addison-Wesley, Publishing Company, Reading, Massachusetts (1962)

Fundación de promoción, investigación y educación para la seguridad alimentaria (PROSAIA). Argentina, *Guía n° 1 G.F: Guía técnica para la conducción de estudios de metabolismo y cinética de residuos de agentes farmacológicos de uso veterinario en animales productores de alimentos*, septiembre 2010, Revisión: abril 2013

Fundación de promoción, investigación y educación para la seguridad alimentaria (PROSAIA). Argentina, *Guía 2: Guía para la validación de métodos analíticos para la determinación de residuos y matrices biológicas*

3 Términos y definiciones

Para los fines de este documento, se aplican los siguientes términos y definiciones.

3.1

Canasta alimenticia estándar

Estimación de la cantidad total de alimento de origen animal que es consumida diariamente por un adulto de 60 kg.

Nota 1: La canasta alimenticia básica usa cifras arbitrarias de consumo que se basan en los percentiles superiores de la ingesta diaria de alimentos de origen animal.

Nota 2: Las cifras de consumo diario de alimentos de origen animal son:

Para mamíferos: 300 g de músculo, 50 g de grasa o grasa y piel, 100 g de hígado y 50 g de riñón.

Para aves: 300 g de músculo, 90 g de grasa y piel, 100 g de hígado y 10 g de riñón.

Para peces: 300 g de músculo y piel en proporciones naturales.

Se consideran además un consumo de 1,5 l de leche, 100 g de huevos y 20 g de miel.

Nota 3: La estimación del riesgo del consumo de residuos presentes en una canasta alimenticia, se realiza teniendo en cuenta la IDA.

3.2

Principio activo

Sustancia farmacológicamente activa

Sustancia que puede utilizarse para la curación, mitigación, tratamiento, prevención o diagnóstico de las enfermedades del hombre o de los animales.

3.3

Ingesta Diaria Admisible (IDA)

Estimación de la cantidad de un medicamento veterinario, expresada sobre la base del peso del cuerpo, que puede ser ingerida diariamente durante la vida sin presentar un riesgo apreciable para la salud (peso humano promedio: 60 kg).

[FUENTE: NORDOM 557: 2018 Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos - Términos y definiciones]

3.4

Intervalo de confianza

Valores entre los cuales se espera hallar con cierto grado de certeza el valor de un parámetro poblacional.

3.5

Límite Máximo de Residuo (LMR)

Concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o µg/kg sobre la base del peso fresco) que la comisión del Codex Alimentarius recomienda que se permita legalmente o se reconozca como admisible dentro de un alimento o en la superficie del mismo.

[FUENTE: NORDOM 557: 2018 Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos - Términos y definiciones]

3.6

Límite de cuantificación (LOQ)

Menor concentración de un analito, cuya presencia se puede determinar con un grado específico de exactitud y precisión, dentro de límites estadísticos establecidos.

3.7

Límite de detección (LOD)

Menor concentración de un analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en una muestra dentro de límites estadísticos establecidos.

3.8

Límites de tolerancia

Valores extremos de una serie de valores (intervalo) entre los cuales se espera hallar con cierto grado de certeza un determinado porcentaje de los individuos de una población determinada.

3.9

Medicamento veterinario

Sustancia que se aplica o administra a cualquier animal destinado a la producción de alimentos, como los que producen carne o leche, las aves de corral, peces o abejas, tanto con fines terapéuticos como profilácticos o de diagnóstico, o para modificar las funciones fisiológicas o el comportamiento.

[FUENTE: NORDOM 557: 2018 Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos - Términos y definiciones]

3.10

Período de retiro

Período que transcurre entre la última administración de un medicamento y la recolección de tejidos comestibles o productos provenientes de un animal tratado, que asegura que el contenido de residuos en los alimentos se ajusta al límite máximo permitido de residuos para los medicamentos veterinarios (LMRMV).

[FUENTE: NORDOM 557: 2018 Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos - Términos y definiciones]

3.11

Producto Veterinario

Sustancia química, biológica, biotecnológica o preparación manufacturada cuya administración sea individual o colectiva directamente suministrado o mezclado con los alimentos o agua de bebida, con destino a la prevención, diagnóstico, curación o tratamiento de las enfermedades de los animales incluyendo en ello a aditivos, suplementos, promotores, mejoradores de la producción animal, antisépticos, desinfectantes de uso ambiental o en equipamientos y ectoparasiticidas y todo otro producto que, utilizado en los animales y su hábitat, proteja, restaure o modifique sus funciones orgánicas y biológicas. Comprende además los productos destinados al embellecimiento de los animales.

3.12

Residuo marcador

Analito que es confiable para determinar la presencia de residuos de un determinado principio activo en un tejido.

Nota 1: El residuo marcador puede ser la molécula madre o cualquiera de sus metabolitos, productos de degradación o una combinación de cualquiera de estos.

Nota 2: El marcador también puede ser un derivado químico de uno o varios de los componentes del residuo.

Nota 3: La relación entre el residuo marcador y la concentración de los residuos de interés en los tejidos comestibles deberá ser conocida (residuo marcador/residuos de interés).

Nota 4: El LMR refleja entonces la mayor concentración permitida del residuo marcador en los tejidos comestibles.

3.13

Residuo total

Medicamento de origen juntamente con todos los metabolitos y productos provenientes de este medicamento que permanecen en el alimento después de que el medicamento se ha administrado a los animales productores de alimentos.

Nota 1: La cantidad de residuos totales se determina generalmente mediante un estudio en el que se utiliza un medicamento marcado con radio y se expresa como el equivalente del medicamento de origen en mg/kg del alimento.

3.14

Residuo de importancia toxicológica

Residuo de interés para la estimación de una exposición basada en una IDA toxicológica.

Nota 1: Este incluye normalmente todos los compuestos relacionados con la molécula (molécula madre con los metabolitos) y en la mayoría de los casos es idéntica a la totalidad de residuos determinada por estudios de depleción tisular radiométricos.

Nota 2: Si se demuestra que un componente del residuo o una fracción de la totalidad de los residuos es toxicológicamente inactivo, es posible descontar ésta del residuo total o cualquier otra fracción de residuos que no sea biodisponible por vía oral o de metabolitos de los que se sabe que son toxicológicamente inactivos.

3.15

Residuo de interés farmacológico

Residuo de importancia para la estimación de una exposición basada en una IDA farmacológica.

Nota 1: Normalmente se considera a la molécula madre más cualquier otro residuo de la misma.

Nota 2: En ausencia de datos sobre actividad farmacológica de los componentes del residuo total, se asume que el total de residuos presenta la misma actividad farmacológica que la molécula madre.

3.16

Residuo de interés microbiológico

Residuo que tiene importancia para la estimación de una exposición basada en una IDA microbiológica.

Nota 1: En la mayoría de los casos este es idéntico a los residuos que se determinan en ensayos microbiológicos.

Nota 2: En ausencia de tales datos, puede ser usado el residuo total o alternativamente la suma de los componentes individuales de los que se conoce que presentan actividad microbiológica.

Nota 3: Por lo tanto, se asume que la actividad microbiológica del residuo total o de los metabolitos y/o productos de degradación es igual a la molécula madre.

3.17

Sitio de inyección

Área de tejido en donde el medicamento veterinario ha sido inyectado.

Nota 1: Las muestras de tejido obtenidas de los sitios de inyección para la realización de estudios de residuos, deberán ser representativas de lo que con probabilidad puede ser seleccionado como tejido comestible en los procedimientos de faena.

Nota 2: La muestra de tejidos deberá incluir tejido muscular, tejido conectivo y grasa subcutánea en proporciones naturales (el recorte de las muestras para eliminar el tejido conectivo y la grasa adherida al músculo se consideran procedimientos artificiales que se alejan de la situación real).

Nota 3: Los sitios de inyección no deberán incluir la porción de piel que recubre al mismo, dado que esta no es requerida para el análisis de los residuos.

3.18

Tejido

Todo tejido animal comestible, inclusive músculos y subproductos.

4 Estimación del período de retiro

4.1 Modelo estadístico

El cálculo del período de retiro mediante el método estadístico, se basa en principios aceptados de farmacocinética básica. Tomando como base un modelo farmacocinético de un compartimiento, la relación entre la concentración de un principio activo y el tiempo durante las fases de absorción, distribución y eliminación, puede ser descrita por términos matemáticos multiexponenciales. Sin embargo, la eliminación de dicha sustancia y/o sus metabolitos desde los tejidos, da lugar a una curva de concentraciones tisulares que sigue una declinación exponencial de orden uno, la que puede ser adecuadamente descrita por un modelo de un compartimiento con un solo término exponencial. La ecuación de primer orden aparente que describe la cinética de depleción tisular es la siguiente:

$$C_t = C_0 e^{-kt} \quad (1)$$

donde

C_t es la concentración tisular a un tiempo dado;

C_0 es la concentración de residuo a tiempo cero;

e es la base de los logaritmos naturales;

k es la constante de primer orden aparente de eliminación;

t es el tiempo.

El término C_0 representa el punto de intersección en el eje de la ordenada a tiempo cero, el mismo es en realidad solo una concentración teórica necesaria para el ajuste de los datos experimentales con el modelo de un solo término exponencial. Por pertenecer a una ecuación que describe una función exponencial decreciente, la constante lleva signo negativo. La linealidad de la gráfica del logaritmo natural de las concentraciones tisulares en función del tiempo ($\ln C_t$ vs t), proporciona evidencia de que el modelo de un término exponencial es aplicable y de que el análisis estadístico de regresión lineal de los datos transformados logarítmicamente, puede ser considerado como método confiable para la estimación del período de retiro. En ese caso, los datos experimentales pueden ser descritos por la ecuación de primer grado, también conocida como ecuación general de una recta que está dada por la siguiente expresión:

$$y = a + bx \quad (2)$$

donde y es un valor sobre el eje de la ordenada, x es un valor en el eje de la abscisa, a es el punto donde la recta cruza al eje de la ordenada y b indica la cantidad con la cual y cambia por cada unidad de cambio en x . El valor de a se conoce como ordenada en el origen y el valor de b como pendiente de la recta. El procedimiento que se utiliza para obtener la recta deseada se conoce como método de cuadrados mínimos, y la recta resultante (mejores valores promedios estimados en cada punto de muestreo) se conoce como recta de cuadrados mínimos.

4.1.1 Base de datos

4.1.1.1 El análisis de regresión lineal requiere que los datos experimentales sean independientes unos de otros. Corrientemente los datos de depleción tisular reúnen esta condición debido a que se originan de diferentes individuos.

4.1.1.2 En caso de disponer de mediciones duplicadas o triplicadas de concentraciones tisulares de una única muestra, para la realización del análisis de regresión lineal se empleará el valor promedio.

4.1.1.3 Para evitar el error en el cálculo de la pendiente y el punto de intersección, cada dato de concentración tisular deberá en lo posible, originarse del mismo número de mediciones repetidas.

4.1.1.4 Como indicación general de acuerdo con la especie animal se debería emplear entre 4 y 10 animales por punto de muestreo (día de sacrificio). Un esquema básico sería disponer de datos de concentraciones tisulares de 16 animales, los cuales serían sacrificados en grupos de 4 individuos en 4 días de sacrificio convenientemente distribuidos.

4.1.1.5 Los datos experimentales de concentración tisular que sean mayores al límite de detección (LOD) y menores al límite de cuantificación (LOQ) tienen un valor informativo, aunque no estrictamente cuantificable. Por tanto, si es necesario que sean incluidos en el análisis, serán considerados como valores opcionales y su uso deberá ser fundamentado correctamente.

4.1.1.6 Se deberán excluir del análisis los datos experimentales reportados como menores al LOD.

4.1.1.7 Cuando todos o algunos de los datos experimentales reportados en un día de sacrificio sean opcionales, deberá considerarse la posibilidad de excluir del análisis al tiempo de sacrificio correspondiente. Deberá tenerse en cuenta que se precisa un mínimo de tres puntos de muestreo (días de sacrificio) tomados durante la fase de eliminación terminal y un mínimo de tres muestras (animales) por punto de muestreo para poder realizar un análisis de regresión lineal.

4.1.1.8 Los datos experimentales de concentración tisular deberán ser reportados tal cual ellos fueron cuantificados, es decir sin ser corregidos por los valores de recuperación de la técnica analítica, los cuales deberán ser adjuntados con los datos de los experimentos de recuperación y el factor de corrección que deriva de ellos. En este caso, antes de realizar el análisis de regresión lineal, los datos experimentales deberán corregirse con el factor de corrección de recuperación antes de ser transformados logarítmicamente. Cuando el ensayo es hecho usando una curva de calibración obtenida con muestras fortificadas antes del proceso de extracción no hay necesidad de realizar corrección por recuperación.

4.1.2 Supuestos del análisis de regresión lineal

Para realizar un análisis de regresión lineal es necesario que se cumplan los siguientes supuestos básicos:

- a. Que existe homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) entre los $\ln$ de los datos experimentales en cada punto de muestreo (día de sacrificio);
- b. Que existe linealidad de los $\ln$ de los datos experimentales en función del tiempo;
- c. Que existe distribución normal (gaussiana) de los errores.

4.1.2.1 Homogeneidad de varianzas (homocedasticidad)

Deberá confirmarse que las varianzas de los $\ln$ de los datos experimentales de los diferentes días de sacrificio son homogéneas. Diferentes test estadísticos pueden ser usados para este propósito, tales como el test de Bartlett, el test de Hartley y el test de Cochran.

4.1.2.2 Linealidad del $\ln$ de los datos experimentales

4.1.2.2.1 La inspección visual de la gráfica de los $\ln$ de los datos experimentales en función del tiempo, es a menudo suficiente, para asegurar que existe relación lineal entre los datos experimentales.

4.1.2.2.2 Un desvío de la linealidad de los $\ln$ de los datos experimentales en los primeros tiempos de muestreo, puede indicar que el proceso de distribución de los residuos marcadores aún no ha concluido y, por lo tanto, estos puntos deberían ser excluidos del análisis.

4.1.2.2.3 Desviaciones de la linealidad en los últimos puntos de muestreo pueden ser debidas a concentraciones por debajo del LOD, por lo tanto, el proceso cinético de depleción tisular no deberá ser considerado en estos tiempos de muestreo y está justificada la exclusión de estos valores del análisis estadístico.

4.1.2.2.4 Deberá tenerse en cuenta que el resto de los datos experimentales presentes en los restantes puntos de muestreo deberá ser conservado, a menos que su exclusión esté debidamente justificada.

4.1.2.2.5 Para asegurar estadísticamente la linealidad de la recta de regresión, deberá realizarse un análisis de varianza. El procedimiento consiste en comparar la variación entre los grupos de medias y la recta estimada con la variación entre animales dentro de los grupos.

4.1.2.3 Normalidad de los errores

4.1.2.3.1 La distribución normal de los errores puede ser observada mediante inspección visual de las residuales ordenadas versus su frecuencia de distribución acumulativa en una escala de probabilidad normalizada.

4.1.2.3.2 Las residuales, son las diferencias entre los valores observados y sus correspondientes valores estimados (diferencia entre los valores transformados logarítmicamente y los valores estimados por la recta de regresión).

4.1.2.3.3 Una línea recta, indica que la distribución de las residuales observada es consistente con el supuesto de una distribución normal. Para verificar los resultados del gráfico de residuales, se puede aplicar el test de Shapiro-Wilk. Este test ha demostrado ser eficaz aún en presencia de muestras pequeñas.

4.1.2.3.4 La gráfica de la frecuencia acumulativa de distribución de las residuales puede ser usada como un test muy sensible. Las desviaciones a partir de la línea recta indican una distribución no normal de las residuales, la cual puede ser debida a:

- a) Desvíos a partir de la normalidad de los datos de las concentraciones tisulares de los residuos marcadores transformados logarítmicamente dentro de uno o más grupos de sacrificio;
- b) Desvíos a partir de los valores estimados por la regresión lineal (recta de regresión);
- c) No homogeneidad de varianzas (heterocedasticidad);
- d) Valores aberrantes.

4.1.2.3.5 En la presentación de los datos experimentales usando las residuales normalizadas (residual dividida por el error residual S_y , x), un valor aberrante podría presentar un valor <-4 o $> +4$, indicando que la residual presenta un valor desviado cuatro desvíos estándar de la línea de regresión. El uso que se dé a este tipo de datos deberá ser justificado, teniendo en cuenta la información que se tenga sobre el animal del cual proviene la muestra.

4.1.3 Procedimiento estadístico basado en el LMR

4.1.3.1 El período de retiro deberá ser calculado usando los resultados de los datos estimados por la línea de regresión. El período de retiro es el tiempo en el que el límite superior del intervalo de tolerancia al 95% estimado con un intervalo de confianza al 95% intersecta al valor del límite máximo de residuos (LMR).

4.1.3.2 Si este tiempo no corresponde a un día completo, el período de retiro estimado se redondea hasta el día siguiente. Por ejemplo, si el período de retiro estimado es 6.3 días, entonces éste se fija en 7 días.

4.1.3.3 El valor del límite superior del intervalo de tolerancia al 95% con un intervalo de confianza al 95%, se calculará empleando el método de distribución de t no centralizada que se describe en el anexo.

4.1.3.4 No es válido estimar el período de retiro a partir de la ausencia de datos de concentración tisular menores al LMR. Por lo tanto, para calcular el mismo se deberá disponer de datos experimentales que presenten valores menores al LMR en al menos el último tiempo de muestreo. Dada esta perspectiva se necesita que el LOQ de la técnica analítica sea siempre menor al LMR utilizado. Se recomienda que el LOQ sea al menos la mitad del LMR.

4.1.3.5 El período de retiro puede ser estimado usando el software WT1.4 recomendado por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés). El período de retiro también puede ser estimado usando el método desarrollado por Stange, que es propuesto por la EMA. Este es metodológicamente más sencillo de realizar y proporciona resultados comparables al método que emplea la distribución de t no centralizada.

4.1.4 Procedimiento alternativo basado en el LMR

4.1.4.1 Este procedimiento, también conocido como “regla de decisión” es un método alternativo cuando los datos experimentales disponibles no permiten el uso del modelo estadístico basado en el LMR.

4.1.4.2 No es posible proponer recomendaciones generales para este procedimiento, ya que los resultados van a depender del tamaño de la muestra, el momento en el que se realice el sacrificio de los animales, la toma de las muestras biológicas, la variabilidad de los datos experimentales y los factores relacionados a la metodología analítica.

4.1.4.3 El método se basa en fijar el período de retiro, al momento en el que las concentraciones tisulares de todos los animales se encuentren por debajo del valor del LMR. Sin embargo, una vez que se ha estimado este tiempo, deberá ser fijado un margen de seguridad para compensar la incertidumbre biológica que representa la variabilidad de la cinética de depleción tisular.

4.1.4.4 La dimensión del margen de seguridad va a depender de varios factores asociados al diseño experimental y a las propiedades farmacocinéticas del principio activo en estudio.

4.1.4.5 Aunque no es posible proporcionar una recomendación general aplicable a todos los casos, una guía aproximada para calcular la duración del margen de seguridad es incrementar en un 10% - 30% el valor del tiempo en el que todas las concentraciones tisulares se hallan por debajo del LMR. Otra alternativa es incrementar el mencionado tiempo en un valor equivalente a 1-3 veces la semivida de depleción tisular.

4.2 Tiempo de retiro estimado a partir de los residuos en el sitio de inyección

Además del efecto de la formulación, dosis y frecuencia de administración sobre la duración del período de retiro, éste está influido sustancialmente por la vía de administración. Las formulaciones inyectables pueden presentar una cinética de eliminación de residuos desde el sitio de inyección significativamente más lenta que la observada en el resto de los tejidos comestibles. Este fenómeno puede atribuirse al diseño de sistemas de liberación lenta, formulaciones de depósito, propiedades físico-químicas de la molécula, la vía de administración subcutánea, intramuscular u otros factores atribuibles a la variabilidad de la vía de administración (ej.: en el tejido conectivo entre los músculos semitendinoso y semimembranoso). A diferencia de otros tejidos, la localización exacta de las muestras de los sitios de inyección destinadas para su análisis puede tener un impacto considerable sobre la concentración de residuos hallada. Además, el metabolismo y/o degradación de los principios activos en el sitio de

inyección puede ocasionar que la composición del residuo total pueda ser muy diferente respecto de lo hallado en otros tejidos. Todo esto muestra que, desde un punto de vista farmacológico, el sitio de inyección no es comparable en forma directa con músculo u otros tejidos comestibles. De la misma manera, los períodos de retiro establecidos para tejido muscular de localización remota respecto del sitio de inyección, no son adecuados para garantizar que los residuos presentes en el sitio de inyección hayan disminuido a concentraciones seguras. Hay que tener en cuenta que el procedimiento para calcular los LMR incluye un análisis de riesgo de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos basado en la IDA, la cual considera la exposición dietética a los residuos a lo largo de toda la vida. Por lo tanto, los residuos en el sitio de inyección necesitan una consideración particular respecto del riesgo para los consumidores de los animales tratados.

4.2.1 Interpretación

4.2.1.1 Deberá tenerse en cuenta que el período de retiro en el sitio de inyección estimado de acuerdo a esta guía, no necesariamente deberá ser considerado como el período de retiro definitivo para el producto veterinario en estudio.

4.2.1.2 El período de retiro en el sitio de inyección deberá ser considerado en comparación con los períodos de retiro basados en la depleción de residuos en los otros tejidos comestibles. Finalmente, el período de retiro seleccionado para el medicamento veterinario en consideración deberá estar debidamente justificado.

4.2.2 Principios generales

4.2.2.1 Los residuos de interés que permanecen en el sitio de inyección necesitan ser conocidos. En el caso de los medicamentos veterinarios que contienen nuevos principios activos, es necesario realizar una apropiada caracterización de los residuos relacionados a las moléculas activas, incluyendo metabolitos y productos de degradación y/o conversión de posible impacto biológico. Esta información se obtiene en estudios de depleción de residuos radiométricos (ej. residuo total) o cuando fuere apropiado, en estudios de depleción de residuos orientados a la caracterización toxicológica, farmacológica y microbiológica de los mismos.

4.2.2.2 Para medicamentos veterinarios que contienen principios activos conocidos y de los cuales se conoce la composición de los residuos en el sitio de inyección, los estudios de depleción de residuos radiométricos no son necesarios, y sólo se requiere la valoración del principio activo original o cualquier otro componente relevante del residuo en el sitio de inyección (ej. el residuo marcador). La información referida a la relación entre residuo marcador/residuo total, puede ser obtenida a partir de la información disponible en la literatura.

4.2.3 Diseño del estudio y toma de muestras

4.2.3.1 Para la toma de muestra se recomienda consultar la Guía n° 1 G.F: “Guía técnica para la conducción de estudios de metabolismo y cinética de residuos de agentes farmacológicos de uso veterinario en animales productores de alimentos”, ítem 4.6.2.

4.2.3.2 El reporte del estudio de depleción de residuos en el sitio de inyección deberá acompañarse de una descripción completa y detallada del diseño y las condiciones experimentales, la selección del sitio de inyección del producto, la técnica usada para la inyección, el instrumental utilizado, la profundidad de la inyección (intramuscular), medidas tomadas para permitir la localización precisa del sitio de inyección al momento del sacrificio, detalle de la técnica de obtención y acondicionamiento de la muestra.

4.2.4 Procedimiento

4.2.4.1 Con respecto a la ingestión de residuos en el punto de inyección, como se dijo, deberá tenerse en cuenta que se trata de un evento esporádico. Por tanto, la determinación del período de restricción de uso deberá basarse en parámetros que permitan cuantificar el riesgo de la exposición dietética a corto plazo. Dependiendo de las características del principio activo, el concepto de la dosis de referencia aguda (ARfD) sería el más adecuado. Sin embargo, en algunos casos puede ser más adecuado algún otro parámetro de referencia y también deberá tenerse en cuenta que para muchos principios activos la ARfD no está disponible. Para estos casos deberá proponerse y justificarse algún otro límite de referencia entre los que pueden mencionarse los siguientes: dosis terapéutica humana, cantidad máxima de ingestión recomendada (ej. vitaminas), máximo nivel de ingesta tolerable (ej. minerales/elementos traza), niveles basales o naturales para compuestos que pueden ser producidos de manera endógena (ej. hormonas). Deberá considerarse la aplicación de un factor de seguridad a cualquier límite de referencia que sea seleccionado.

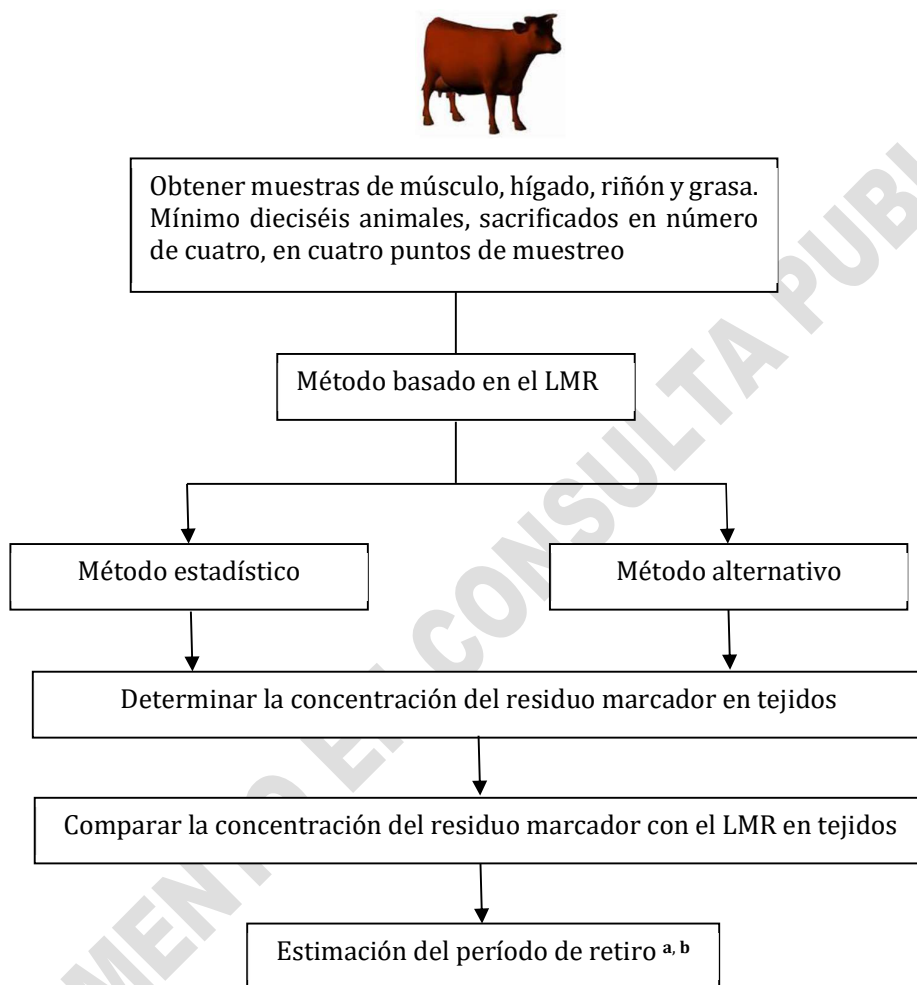
4.2.4.2 También puede transformarse el LMR de músculo o grasa (de acuerdo a la especie animal o al principio activo que se trate), aplicando un factor de 10 o más en un límite de referencia apropiado para este uso. La selección de cualquier límite de referencia deberá estar justificada.

4.2.4.3 Cuando este procedimiento es aplicado, deberá sin embargo corroborarse que el residuo marcador es válido para predecir los residuos de interés en el sitio de inyección.

4.2.4.4 El tiempo de retiro deberá asegurar que la concentración de los residuos haya disminuido por debajo del límite de referencia seleccionado para el sitio de inyección. Su cálculo deberá ser realizado de acuerdo a lo descrito para los tejidos comestibles en los puntos 4.1.3 y 4.1.4.

4.3 Esquema comparativo de muestreo y análisis de los tejidos comestibles y estimación del período de retiro mediante el procedimiento basado en el LMR.

La figura 1 muestra el esquema que resume los procedimientos propuestos para muestreo y estimación del período de retiro en base al LMR.



^a El período de retiro deberá ser estimado para todos los tejidos comestibles y será calculado en base a los procedimientos propuestos en esta guía. El período de retiro más prolongado será considerado el más apropiado.

^b Si el producto veterinario se administró por vía parenteral (IM – SC), el período de retiro del tejido muscular será reemplazado por el período de retiro de los tejidos en el sitio de inyección.

Figura 1 — Esquema comparativo de muestreo y análisis de los tejidos comestibles y estimación del período de retiro mediante el procedimiento basado en el LMR.

Anexo A

Procedimientos estadísticos

A.1 Test de Bartlett

A.1.1 El test de Bartlett, es usado para chequear si un número de k muestras provienen de poblaciones que presentan varianzas similares. La igualdad de varianzas entre diferentes muestras se denomina homogeneidad de varianzas u homocedasticidad.

A.1.2 El uso del test de Bartlett se justifica en el hecho que muchos test estadísticos como por ejemplo el test de diferencias de medias de t -de Student o el análisis de varianza asumen que las varianzas entre diferentes muestras son iguales.

A.1.3 La agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU, recomienda el uso de este test debido a su robustez, aunque es extremadamente sensible a desvíos de normalidad. Por otra parte, este test sólo puede ser usado cuando cada grupo de datos es igual o mayor a 5. Presenta la ventaja de que se pueden comparar grupos de datos de diferentes tamaños.

A.1.4 El test de Bartlett se usa para chequear la hipótesis nula, H_0 de que las varianzas poblacionales son iguales, respecto de la hipótesis alternativa H_1 de que al menos dos son diferentes. Si disponemos de k muestras con un tamaño de n_i muestras y una varianza S_i^2 el estadístico de Bartlett es:

$$X^2 = \frac{(N-k) \ln(S_p^2) - \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \ln(S_i^2)}{1 + \frac{1}{3(k-1)} \left(\sum_{i=1}^k \left(\frac{1}{n_i - 1} \right) - \frac{1}{N-k} \right)} \quad (\text{A.1})$$

donde

$$N = \sum_{i=1}^k n_i$$

$$S_p^2 = \frac{1}{N-k} \sum_{i=1}^k (n_i - 1) S_i^2 \text{ es el estimador de la varianza total.}$$

A.1.5 El estadístico del test de Bartlett tiene aproximadamente una distribución X_{k-1}^2 . La hipótesis nula es rechazada cuando $X^2 > X_{k-1, \alpha}^2$, donde $X_{k-1, \alpha}^2$, es el valor crítico superior para una distribución X_{k-1}^2 .

A.2 Test de Hartley

A.2.1 Este test, desarrollado en 1950 por Hartley, y es también conocido como el test de $F_{\max}$ o el test de $F_{\max}$ de Hartley. Es utilizado en el análisis de varianza para verificar que diferentes grupos tienen varianzas similares, condición indispensable para realizar comparaciones entre grupos mediante la aplicación de test estadísticos paramétricos. El test presenta la desventaja de que sólo puede usarse para comparar grupos de datos de igual tamaño.

A.2.2 El test se basa en el cálculo de la relación entre la varianza grupal mayor ($\max s_j^2$) y la varianza grupal menor ($\min s_j^2$). El valor resultante, es entonces comparado con el valor crítico presente en una tabla de distribución de $F_{\max}$.

A.2.3 Se asume que los grupos presentan varianzas similares si el valor calculado es menor que el valor crítico.

A.2.4 El test de Hartley asume que los datos de cada grupo presentan distribución normal y que los grupos presentan igual número de individuos. Este test, aunque conveniente, es poco sensible a desvíos de distribución normal.

A.3 Test de Cochran

A.3.1 Este test, desarrollado por William Gemmell Cochran es un análisis de dos vías de bloques aleatorios, donde el resultado de la comparación sólo puede tener dos resultados. El test de Cochran, también conocido como Test Q de Cochran, es un test de estadística no paramétrica.

A.3.2 La Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés), considera que éste es el mejor test, ya que es más sencillo que el test de Bartlett. Por otra parte, es menos sensible a desvíos de normalidad que este último y además puede ser usado para analizar grupos de datos de diferente tamaño.

A.3.3 El test asume que el número de tratamientos experimentales es mayor a dos ($k > 2$) y que las observaciones están organizadas en un determinado número (b) bloques tal como se presenta en la tabla A.1:

Tabla A.1 — Relación tratamientos experimentales/ bloques de observaciones del test de Cochran

	Tratamiento 1 (k_1)	Tratamiento 2 (k_2)		Tratamiento i (k_i)
Bloque 1 (b_1)	X_{11}	X_{12}		X_{1k}
Bloque 2 (b_2)	X_{21}	X_{22}		X_{2k}
Bloque 3 (b_3)	X_{31}	X_{32}		X_{3k}
Bloque 4 (b_4)				
Bloque i (b_i)	X_{h1}	X_{h1}		X_{hk}

A.3.4 El test de Cochran parte de la hipótesis nula (H_0) que afirma que los tratamientos son iguales, y la hipótesis alternativa (H_1) afirma que existe diferencia entre los tratamientos.

A.3.5 El estadístico del test de Cochran es:

$$T = k(k-1) \sum_{j=1}^k (X_{.j} - \frac{N}{k})^2 / \sum_{i=1}^b X_{i.} (k - X_{i.}) \quad (A.2)$$

Donde

- k es el número de tratamientos
- $X_{.j}$ es el valor total de las columnas al $j^{\text{ésimo}}$ tratamiento
- b es el número de bloques
- $X_{i.}$ es el valor total de las celdas al $i^{\text{ésimo}}$ bloque
- N es el valor del total de las muestras

El nivel de significancia de la región crítica está dado por:

$$T > X_{1-\alpha, k-1}^2$$

donde $X_{1-\alpha, k-1}^2$ es el cuantil $(1-\alpha)$ de la distribución de chi-cuadrado con un grado de libertad de $k-1$. La hipótesis nula es rechazada si el valor del estadístico cae dentro de la región crítica.

A.4 Test de Shapiro-Wilk

A.4.1 Este test fue publicado en 1965 por Samuel Shapiro y Martin Wilk, y se emplea para chequear la hipótesis nula (H_0) de que una muestra $X_1, \dots, X_n$ proviene de una población con distribución normal.

A.4.2 El test parte de la hipótesis nula (H_0) que afirma que los datos experimentales provienen de una población con distribución normal, y la hipótesis alternativa (H_1) afirma que los datos experimentales provienen de una población con distribución no normal. El estadístico del test es el siguiente:

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (A.3)$$

donde:

- $x_{(i)}$ es el $i^{\text{ésimo}}$ orden estadístico, ej: el menor valor en la muestra
- $\bar{x}$ es la media de la muestra.

A.4.3 Las constantes a_i están dadas por la siguiente ecuación:

$$(a_1, \dots, a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}} \quad (\text{A.4})$$

donde

$$m = (m_1, \dots, m_n)^T$$

$m_1, \dots, m_n$ son valores esperados del orden estadístico de variables independientes y con idéntica distribución aleatoria, provenientes de poblaciones con distribución normal, y V es la matriz de covarianza de esos ordenes estadísticos.

A.4.4 La hipótesis nula se rechaza cuando el valor del estadístico (W) es menor que el error alfa seleccionado (0.05). En caso que el estadístico (W) sea mayor al nivel alfa seleccionado, entonces no se puede rechazar la hipótesis nula y se asume que los datos experimentales provienen de una población con distribución normal.

A.5 Cálculo del límite superior del intervalo de tolerancia

Si bien la FDA propone estimar el límite superior del intervalo de tolerancia al 99% con un intervalo de confianza al 95%, una objeción que se le hace a este criterio, es la excesiva extrapolación de los valores del intervalo de tolerancia, ya que muchas veces este intercepta el valor del LMR en un tiempo posterior a los valores de las últimas concentraciones tisulares detectadas. Esta excesiva extrapolación puede resultar en una inadecuada estimación del tiempo de retiro. La EMEA, propone un intervalo de tolerancia al 95%, lo cual minimiza el problema de la extrapolación y proporciona una estimación más realista del tiempo de retiro.

A.6 Método de distribución de t no centralizada (FDA)

A.6.1 El límite superior del intervalo de tolerancia a cualquier tiempo se calcula según la siguiente ecuación:

$$T(y) = a + b \cdot t + k \cdot s \cdot \left[\frac{1}{n} \cdot \left(\frac{t - \bar{x}t}{\sum t_i - \bar{x}t} \right)^2 \right]^{0.05} \quad (\text{A.5})$$

donde:

k = el 95^{mo} percentil de una distribución de " t " no centralizada con un parámetro no centralizado " d " y grados de libertad igual a S^2 .

$$d = \frac{z}{\left[\frac{1}{n} \cdot \left(\frac{t - \bar{x}t}{\sum t_i - \bar{x}t} \right)^2 \right]^{0.05}} \quad (\text{A.6})$$

z = 95^{mo} percentil de una distribución estándar normalizada.

Para calcular el valor de “k”, referirse a Owen, D.B., *Handbook of Statistical Tables*, Addison-Wesley, Publishing Company, Reading, Massachusetts (1962). Empleando el valor de “d” y la tabla de factores para el cálculo de los valores críticos de la distribución de “t” no centralizada con un percentil del 95% (0.95) y “n” grados de libertad.

A.6.2 El límite superior del intervalo de tolerancia se calcula como el antilogaritmo del valor calculado. Inspeccionar que el valor estimado no exceda el valor del LMR, si esto ocurre se deberá incrementar el valor de t y repetir el procedimiento de cálculo hasta que el valor calculado sea inferior al LMR, en ese caso el valor de t se corresponde con el tiempo de retiro.

A.7 Método de Stange (EMEA)

A.7.1

El cálculo del límite superior del intervalo de tolerancia al 95% con un intervalo de confianza al 95% puede realizarse también con el procedimiento reportado por de Stange el cual se describe a continuación:

$$Ty = a + bt + k_T s_{y,x} \quad (A.7)$$

donde:

Ty = límite superior del intervalo de tolerancia a un tiempo de muestreo determinado
 a = punto donde la recta cruza al eje de la ordenada
 b = pendiente de la recta
 t = tiempo.

$$k_T = \frac{\sqrt{(2n-4)}}{(2n-4)^* - u_{1-\alpha}^2} \left[\sqrt{(2n-4)^*} u_{1-\gamma} + u_{1-\alpha} W_n \right] \quad (A.8)$$

$$W_n = \sqrt{u_{1-\gamma}^2 + [(2n-4)^* - u_{1-\alpha}^2] \left[\frac{1}{n} + \frac{(x-\bar{x})^2}{S_{xx}} \right]} \quad (A.9)$$

$$S_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2 \quad (A.10)$$

A.7.2 Los respectivos valores estadísticos de la distribución normal estandarizada son:

Para $1-\alpha = u$, $1-\alpha = 1.6449$
 Para $1-\gamma = u$, $1-\gamma = 1.6449$
 $S_{y,x}$ = error residual, $()^* = (2n-5)$ de acuerdo a Graf *et al.*

A.7.3 La corrección propuesta por Graaf (usando el término (2n-5) en lugar de (2n-4), resulta en un límite del intervalo de tolerancia ligeramente mayor. De acuerdo a Stange, la ecuación es válida para un valor de $n \approx 10$, mientras que Graf incrementa la validez del cálculo a un valor de $n \approx 20$.

Bibliografía

- [1] Representación Regional de la OIE para Las Américas, 2^{da} Revisión, 2013, *Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles*
- [2] NORDOM 557: 2018, *Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos - Términos y definiciones*
- [3] NORDOM 884: 2022, *Buenas prácticas de uso de productos veterinarios*
- [4] *Reglamento No. 521-06 para el Registro de Establecimientos y Medicamentos Veterinarios*
- [5] *Decreto 354-10, Reglamento de límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios y afines en alimentos de origen animal*

DOCUMENTO EN CONSULTA PÚBLICA