



## DOCUMENTO GENERAL

### Pauta de validación de métodos de drogas veterinarias, según referencia Reglamento UE 2021/808

#### 1.- OBJETIVO.

Homologar parámetros de validación en el funcionamiento de métodos analíticos de Residuos de Sustancias Farmacológicamente Activas, según Reglamento UE 2021/808, del 21 de marzo 2021.

La homologación de la validación según lo establecido en esta pauta del o los análisis ya autorizados, o los análisis cuya solicitud se presentó según el documento D-ATR-AAT-010, versión 08.

Esta pauta debe ser aplicada a todas las sustancias farmacológicamente activas (drogas veterinarias) que incluye la "Lista de análisis de residuos en productos pecuarios para la autorización de terceros", código D-ATR-AAT-011 (versión vigente).

#### 2.- PAUTA.

Los laboratorios deben seguir el "Pauta de Validación" indicado, para calcular parámetros como Veracidad, Precisión, CC $\alpha$  y CC $\beta$ :

Día Validación	Curva	Nivel Sustancias Autorizadas		
		Nivel 0.1 CI	Nivel 1 CI	Nivel 1.5 CI
1	1	6 replicados	6 replicados	6 replicados
2	2	6 replicados	6 replicados	6 replicados
3	3	6 replicados	8 replicados	6 replicados
		Total 18	Total 20	Total 18

Día Validación	Curva	Nivel Sustancias Prohibidas o No Autorizadas		
		Nivel 0,5 CI	Nivel 1 CI	Nivel 1,5 CI
1	1	6 replicados	6 replicados	6 replicados
2	2	6 replicados	6 replicados	6 replicados
3	3	6 replicados	8 replicados	6 replicados
		Total 18	Total 20	Total 18

Concentración de Interés (CI) o LMR es igual al Límite de Acción del SAG (LA)

#### 3.- REQUISITOS APLICABLES A LOS MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN.

**3.1** Intensidades Relativas: Debe ser desviación relativa +/- 40%, la señal-ruido de todos los iones de diagnóstico será igual o superior a 3:1.

**3.2** Separación Cromatográficas (tiempo retención): la variación del tiempo retención en UPLC es 5% si es inferior a 2 min, cromatografía Líquida 1% y Cromatografía gaseosa de 0,5%.



## DOCUMENTO GENERAL

### Pauta de validación de métodos de drogas veterinarias, según referencia Reglamento UE 2021/808

**3.3** Identificación: GC o LC-MS/MS: 1 precursor + 2 productos o 2 precursores + 2 productos.

**3.4** Cuando no se pueda utilizar patrón interno, la identificación del analito se confirmará, mediante cocromatografía: que se divide la muestra en 2 partes, una parte se cromatografía tal cual y la otra se mezcla con el analito midiéndose esta mezcla.

**3.5** La fortificación en matriz, debe realizarse antes de comenzar la extracción de la muestra.

**3.6** Se considerará "Sustancia No autorizada o prohibida" cuando su concentración de Interés (CI) sea menor o igual a 10 ppb y se debe realizar la validación en 0,5-1-1,5 por nivel.

**3.7** Se considerará "Sustancia Autorizada" cuando su Concentración de Interés (CI) sea mayor a 10 ppb y se debe realizar la validación en 0,1-1-1,5 por nivel. Si no se logra al nivel 0,1 de CI, podrá subir su concentración hasta 0,5 CI.

**3.8** Se debe considerar 1 matriz y 1 especie para validación completa.

#### 4.- PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.

**4.1 Recuperación o Veracidad** (punto 2.2, Reglamento CE 808/2021).

Niveles 0,1 - 1 - 1,5 Concentración de Interés (CI) sustancias autorizadas.

Niveles 0,5 - 1 - 1,5; Concentración de Interés (CI) o VRI sustancias No autorizadas.

Calcular: Concentración por nivel, veracidad media, CV.

Si cumple los requisitos de veracidad del cuadro 1, podrá utilizarse un factor de corrección fijo, en caso contrario, se aplica factor de recuperación obtenido para ese lote.

La recuperación absoluta relativa del método se calculará cuando no se utilice patrón interno o ninguna calibración de matriz enriquecida (punto 2.9, Reglamento CE 808/2021).

Cuadro N°1: Criterios de Aceptación:

VERACIDAD DE LOS MÉTODOS CUANTITATIVOS	
Fracción de masa	Rango
≤1ug/kg	-50% a +20%
> 1ug/kg a 10 ug/kg	-30% a +20%
≥10 ug/kg	-20% a +20%



## DOCUMENTO GENERAL

### Pauta de validación de métodos de drogas veterinarias, según referencia Reglamento UE 2021/808

#### 4.2 Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) según Pauta de Validación del punto 2 de este instructivo.

Niveles 0,1 - 1 - 1,5; Concentración de Interés (CI) para sustancias autorizadas.

Niveles 0,5 - 1 - 1,5; Concentración de Interés (CI) o VRI para sustancias No autorizadas.

**Repetibilidad:** 6 fortificados x cada nivel de interés por día. Si no se logra el 0,1 CI realizarlo en 0,5 CI.

**Reproducibilidad Intralaboratorio:** en todos los niveles de interés (CI) (suma de 3 días) por nivel, diferentes lotes, diferentes reactivos, distintos instrumentos o una variación de otros parámetros.

Calcular: concentración media por nivel, DS, CV.

#### Cuadro N°2: Criterios de aceptación:

Coeficiente de variación aceptable	
Fracción de masa	CV de reproducibilidad (%)
>1000 µg/kg	16 (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
>120 µg/kg - 1000 µg/kg	22 (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
10-120 µg/kg	25*
<10 µg/kg	30*

\*El CV (%) presentado es una orientación y debe ser tan bajo como sea razonablemente posible.

En los casos de análisis efectuados en condiciones de repetibilidad, **el coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad** será igual o inferior a dos tercios de los valores enumerados en el cuadro 2.

#### 4.3 Determinación Selectividad/Especificidad (punto 2.3, Reglamento CE 808/2021).

n ≥ 20 muestras Blancos (1 matriz/diferentes especies).

#### 4.4 Determinación Robustez (punto 2.4, Reglamento CE 808/2021).

Cambios menores que pueden producirse en ensayos rutinarios. Por ejemplo: variaciones en volúmenes o concentraciones de los reactivos, pH, temperatura de incubación o de reacción, calidad de los reactivos y distintitos lotes, diferente pureza, equipamiento.



## DOCUMENTO GENERAL

### Pauta de validación de métodos de drogas veterinarias, según referencia Reglamento UE 2021/808

#### 4.5 Estudio de Estabilidad (punto 2.5, Reglamento CE 808/2021).

Puede basarse en estas directrices:

- a) Según 808/2021.
- b) Punto 185 Directriz CODEX "CAC/GL 71-2009", de acuerdo a las condiciones típicas de almacenamiento y por periodo mínimo de 90 días.

#### 4.6 Calculo de LoD o LoQ.

LoQ debe ser el punto más pequeño y demostrable de la curva de calibración.

LoD puede ser igual o menor al 70% que el LoQ de Sustancias Autorizadas o Concentración de Interés, relación mínima 3:1.

LoD puede ser igual o menor al 50% que el LoQ de Sustancias No autorizadas o Concentración de Interés, relación mínima 3:1.

Demostrables y 6 repeticiones como mínimo para ambos límites.

#### 4.7 Curvas de Calibración (Rango Lineal) (punto 2.8, Reglamento CE 808/2021).

Curva de Calibración en 1 matriz/1 especie, debe contener mínimo:

- 5 niveles incluyendo el cero.
- LoQ.
- LMR o CI del analito.

Curvas en 3 días distintos, se debe evaluar:

- a) Pendientes, Intercepto.
- b) Coeficiente de Determinación ( $R^2 > 0,99\%$ ).
- c) Factor Residual (medido en %).

#### 4.8 Efecto matriz relativo; (punto 2.10, Reglamento CE 808/2021).

Tras extracción, la matriz en blanco debe enriquecerse con el analito al CI o LMR y debe analizarse junto con una disolución pura del analito.

Criterio de aceptación: No debe superar el 20% para el factor matriz.



## DOCUMENTO GENERAL

### Pauta de validación de métodos de drogas veterinarias, según referencia Reglamento UE 2021/808

#### 4.9 Cálculo CC $\alpha$ y CC $\beta$ . (punto 2.6 y 2.7, Reglamento CE 808/2021).

CC $\alpha$ : Según método 1 o 3 para Sustancias No Autorizadas.

CC $\alpha$ : Según método 1 o 2 para Sustancias Autorizadas.

CC $\beta$ : Según método 1,2 o 3, para Sustancias No Autorizadas.

CC $\beta$ : Según método 1, 2 o 3 para Sustancias Autorizadas.

#### 5.- AMPLIACIÓN A OTRAS MATRICES/ESPECIES.

Ampliación a otra Matriz: realizar validación completa.

Ampliación a otras Especies: se debe analizar.

- Curva de Calibración mínimo 5 punto, incluido el cero y LA o CI por cada especie (misma matriz).
- Realizar 6 fortificados al nivel de LA o CI por cada especie (misma matriz).

Calcular:

- a) Efecto Matriz.
- b) % Recuperación.
- c) % CV.
- d) Concentración promedio.

Criterios aceptación: cumplir con los cuadros N°1 y 2.

#### 6.- CONTROL DE CALIDAD APLICADO A RUTINA.

##### 6.1 Método de Rutina por Screening.

- Muestra de Control del instrumento.
- Muestra Blanco Matriz.
- Muestra Blanco Reactivo.
- Muestra de control calidad fortificado al LoQ y LA o CI en duplicado **para sustancias autorizadas.**
- Muestra de control calidad fortificado al LoD y LoQ o CI en duplicado **para sustancias No autorizadas.**
- Muestras 1 a n....
- Muestra en duplicado.

##### 6.2 Método de Rutina para Confirmación.

- Muestra de Control del instrumento.
- Muestra Blanco Matriz.
- Muestra Blanco Reactivo.
- Curva de Calibración en matriz.
- Muestra de control calidad fortificado al LoQ y LMR o CI en duplicado **para sustancias autorizadas.**



## DOCUMENTO GENERAL

### Pauta de validación de métodos de drogas veterinarias, según referencia Reglamento UE 2021/808

- Muestra de control calidad fortificado al LoD y LoQ o CI en duplicado **para sustancias No autorizadas.**
- Calculando el porcentaje de recuperación de los fortificados y su coeficiente de variación.
- Muestra positiva (s).
- Muestra control de calidad fortificada.