
GUÍA LNR: REVALUACIÓN DE VALIDACIONES REALIZADAS SEGÚN DC 2002/657/CE PARA SU ADAPTACIÓN AL REC 2021/808

Ed.01 (Dic 2022)

1. OBJETO

El objetivo principal de este documento es establecer una base común que ayude en el proceso de reevaluación de validaciones realizadas según DC 2002/657/CE conforme a los requisitos del REC 2021/808.

Esta guía es aplicable a validaciones, principalmente convencionales, de métodos LC-MS/MS de confirmación cuantitativos.

En principio, el alcance de la validación se mantendrá igual (analitos, matrices, especies), siempre que se cumplan los criterios incluidos en este documento.

El seguimiento de esta guía garantiza el cumplimiento de los requisitos mínimos exigidos por el REC 2021/808.

Sólo podrá utilizarse hasta el 11/06/2026. A partir de esa fecha, las validaciones según DC 2002/657/CE dejarán de estar en vigor.

2. PASOS A SEGUIR

- Identificar la validación realizada según DC 2002/657/CE que va a ser adaptada al REC 2021/808 (PNT, alcance, código y fecha informe de validación, etc.).
- Revisar la validación siguiendo los apartados 3 y 4.
- Realizar los estudios experimentales necesarios para completar la adaptación al REC 2021/808).
- Elaborar un nuevo informe de validación acorde al REC 2021/808 que sustituya al informe anterior según DC 2002/657/CE.

NOTA:

Una vez se disponga de ese nuevo informe de validación acorde al REC 2021/808, ya se podrían realizar extensiones de validación según REC 2021/808 (siguiendo la "Guía EURL de extensión de métodos" u otros procedimientos que ofrezcan resultados de calidad similar). Ver excepción en apdo. 4.2

3. REVISIÓN DE LA SITUACIÓN LEGAL

En primer lugar, se estudiará la situación legal actual por analito/matriz/especie/otros (LMR¹, CM², VRI / RPA³ o MMPR⁴ según proceda en cada caso) y se comparará con la situación vigente en el momento de la validación DC 2002/657/CE. Los cambios, en caso de existir, deberán ser tenidos en cuenta en el proceso de reevaluación.

4. CRITERIOS Y CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO A EVALUAR -REC 2021/808-

4.1. IDENTIFICACIÓN (punto 1.2 del REC 2021/808)

4.1.1. Requisitos aplicables a la separación cromatográfica (apdo. 1.2.3 del REC 2021/808)

- **Tiempo de retención mínimo:** 2 veces el correspondiente al volumen muerto de la columna.

EL CRITERIO NO HA CAMBIADO: NO ES NECESARIO COMPROBAR

- **Tiempo de retención absoluto -TR (sin patrón interno):**

NUEVO CRITERIO: Tolerancia de ± 0.1 minutos
Si UPLC y el TR es < 2 min, desviación máxima 5 %
COMPROBAR (sólo si se utilizan TR)

-**Tiempo de retención relativo –TRR- (con patrón interno):**

NUEVO CRITERIO: Desviación máxima 1 %.
COMPROBAR (sólo si se utilizan TRR)

4.1.2. Criterios específicos de funcionamiento para espectrometría de masas (apdo. 1.2.4 del REC 2021/808)

4.1.2.1. Relación señal/ruido (apdo. 1.2.4.1 del REC 2021/808)

La relación señal/ruido de todos los iones diagnóstico ha de ser igual o superior a 3:1 ($S/N \geq 3$)

EL CRITERIO NO HA CAMBIADO: NO ES NECESARIO COMPROBAR

4.1.2.2. Intensidades relativas de los iones diagnóstico (relación de iones o ratio) (apdo. 1.2.4.1 del REC 2021/808)

NUEVO CRITERIO: A la relación de iones -o ratio- se le permitirá una desviación relativa de $\pm 40\%$.

Como este criterio es más laxo que el recogido en la DC 2002/657/CE -a excepción de los ratios ≤ 0.1 (para los que había una tolerancia de $\pm 50\%$)-, sólo será necesario comprobar su cumplimiento en este caso.

COMPROBAR QUE LOS RATIOS ≤ 0.1 , en caso de existir, cumplen una desviación relativa de $\pm 40\%$.

4.1.2.3. Identificación /puntos de identificación (apdo. 1.2.4.2 del REC 2021/808)

Para un análisis de confirmación, el REC 2021/808 exige 4 puntos de identificación si se trata de sustancias autorizadas y 5 puntos de identificación en el caso de sustancias no autorizadas o prohibidas. Es decir, se exige 1 punto más respecto de lo que pedía la DC 2002/657. Sin embargo, esto no supone realmente cambios, porque el Reglamento otorga 1 punto por la separación cromatográfica. Por tanto, los métodos que cumplían la 657 en este sentido, cumplen también el nuevo Reglamento.

EL CRITERIO SE CUMPLE: NO ES NECESARIO COMPROBAR.

4.2. NIVELES DE CONCENTRACIÓN VALIDADOS

El REC 2021/808 establece que, como mínimo, hay que validar a 3 niveles de concentración. Según la situación legal, podrán ser los siguientes:

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Sustancias con RPA	0.5 RPA	1.0 RPA	1.5 RPA
Resto de prohibidos o no autorizados	1.0 LCL	2.0 LCL	3.0 LCL
Sustancias con LMR o CM	0.1 LMR / CM	1.0 LMR / CM	1.5 LMR / CM

Es importante resaltar que son valores orientativos. Esto hace más fácil adaptar una validación según DC 2002/657 al nuevo Reglamento.

NOTA: En las nuevas validaciones según REC 2021/808 el punto central (nivel 2) especificado en la tabla debería mantenerse en el caso de sustancias con RPA, LMR o CM-. Además, el rango validado debería incluir el reflejado en la tabla (con la salvedad del 0.1 LMR /CM y del 0.5 RPA, según se especifica en el Reglamento).

CRITERIOS A CUMPLIR (Según la situación legal de las sustancias):

A) Sustancias con RPA

- El RPA en vigor debe estar dentro del rango de cuantificación del método validado según DC 2002/657/CE: si no fuera así, será necesario extender la validación por debajo del nuevo RPA –por ej. 0.5 RPA, 0.75 RPA, etc. (siguiendo la Guía EURL de extensión de validación u otros procedimientos que ofrezcan resultados de calidad similar). Este proceso se deberá realizar para las matrices/especies incluidas en el alcance de la validación DC 2002/657/CE.

- El $CC\alpha$ debe ser \leq al RPA en vigor y además, estar calculado acorde al REC 2021/808. Si no fuera así, habría que calcularlo de nuevo. Y el valor obtenido debería cumplir el requisito de ser \leq al RPA en vigor.

B) Sustancias con LMR o CM

- El LMR o CM en vigor debe ser uno de los puntos validados.
- Sí el punto 0.1 LMR / CM no forma parte de la validación según DC 2002/657, se elegirá una de estas 2 opciones:
 - Realizar una extensión de validación –dentro del proceso de adaptación de DC 2002/657/CE a REC 2021/808- al punto 0.1 LMR / CM.
 - O bien, como el nivel de 0.1 LMR/CM no se considera fundamental para decidir la conformidad de una muestra (el nivel decisorio es el LMR o CM), se podrá ir incluyendo este nivel en las series analíticas que vaya realizando el laboratorio en rutina hasta que se dispongan de datos suficientes para incluirlo en la validación (antes del 11/06/2026).

En cualquiera de las 2 opciones, si razonablemente este nivel no se pudiera alcanzar, se elegirá el nivel más bajo posible comprendido entre 0.1 y 0.5 LMR/CM – demostrando que se ha intentado experimentalmente con al menos 3 adiciones.

C) Resto de sustancias

- Los niveles de concentración validados deberían permitir obtener un valor de CC_{α} calculado según REC 2021/808 inferior al MMPR (recomendación, no obligación de momento). En caso contrario, habría que extender la validación a un nivel de concentración tal que permita el cumplimiento del criterio anterior.

NOTA:

Se podrán realizar extensiones de validación según REC 2021/808 si se está en un proceso de adaptación de DC 2002/657/CE a REC 2021/808 para ajustar los rangos de cuantificación a la nueva situación legal -aunque formalmente no se disponga de un informe de validación según el nuevo Reglamento-.

4.3. ADICIONES REALIZADAS POR NIVEL/NÚMERO DE MUESTRAS EMPLEADAS / DÍAS DE VALIDACIÓN/

El cumplimiento de la DC 2002/657 implica en este sentido el cumplimiento del REC 2021/808.

NO ES NECESARIO REALIZAR NINGUNA COMPROBACIÓN.

4.4. VERACIDAD (punto 1.2.2.1 del REC 2021/808)

La veracidad mínima de los métodos cuantitativos exigida en el Reglamento 2021/808 es idéntica a la exigida en la DC 2002/657 para todos los niveles de concentración e incluso menos exigente en el caso de concentraciones $\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ (la DC 2002/657 permite hasta +10 % y el REC 2021/808 hasta + 20 %).

Por tanto, NO ES NECESARIO REALIZAR NINGUNA COMPROBACIÓN.

4.5. REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD (puntos 2.2.1.3 y 2.2.1.4 del REC 2021/808)

Los criterios de reproducibilidad exigidos en el REC 2021/808 son muy parecidos a los recogidos en la DC 2002/657, aunque al haber cambiado los rangos de concentración en la tabla, será necesario comprobar que se cumplen los criterios siguientes:

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

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

En este sentido, hay que recordar que los CV incluidos en la tabla anterior para concentraciones inferiores a 120 µg/kg son orientativos y deben ser tan bajos como sea razonablemente posible (es decir, podrían ser más altos en algún caso puntual, pero nunca superiores al 50 % ya que serían ilógicos).

En cuanto a repetibilidad, la DC 2002/657 decía que solía estar entre $\frac{1}{2}$ y $\frac{2}{3}$ del valor de reproducibilidad. Como ahora el REC 2021/808 habla de valores de repetibilidad $\leq \frac{2}{3} R$, las validaciones según DC 2002/657 cumplirán también el REC 2021/808. No obstante, al igual que ha sido necesario comprobar que las reproducibilidades se ajustan al REC 2021/808, por la misma razón habrá que asegurarse que las repetibilidades se ajustan a la siguiente tabla:

Fracción de masa	CV de repetibilidad
> 1000 µg/ kg	$\leq \frac{2}{3} \times 16$ (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
> 120 µg/ kg a 1000 µg/ kg	$\leq \frac{2}{3} \times 22$ (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
10 µg/ kg a 120 µg/ kg	$\leq \frac{2}{3} \times 25^*$
< 10 µg/ kg	$\leq \frac{2}{3} \times 30^*$

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

COMPROBAR el cumplimiento de los CV de repetibilidad y reproducibilidad exigidos en el REC 2021/808, en especial para los niveles < 120 µg/kg

4.6. SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD (punto 2.3 del Reglamento 2021/808)

Una validación realizada según DC 2002/657 cumplirá el REC 2021/808 en este sentido. Por tanto, NO ES NECESARIO REALIZAR NINGUNA COMPROBACIÓN

4.7. ESTABILIDAD (punto 2.5 del Reglamento 2021/808)

4.7.1. Determinación de la estabilidad en solución (punto 2.5.1 del Reglamento 2021/808)

Los datos de los que disponga el laboratorio son perfectamente válidos.

4.7.2. Determinación de la estabilidad del analito en matriz (punto 2.5.2 del Reglamento 2021/808)

Los datos de los que disponga el laboratorio son perfectamente válidos. Se recuerda que no es necesario que cada laboratorio realice estudios sobre estabilidad en matriz.

La información procederá en la mayoría de los casos del laboratorio de referencia correspondiente (LNR o LRUE –en el caso de LNR-) o bien de bibliografía. Estos resultados serán extrapolables a todos los laboratorios.

4.8. INCERTIDUMBRE

La estimación de la incertidumbre no era un requisito de la DC 2002/657/CE, aunque la mayoría de los laboratorios la incluían en las validaciones.

El REC 2021/808, en relación a este tema establece:

“La reproducibilidad intralaboratorio y la veracidad son adecuadas para definir la incertidumbre estándar (combinada) de medida, si se determina teniendo en cuenta todos los factores pertinentes de influencia”.

Por otro lado, la Guía EURL de validación de métodos de confirmación dice:

“Since method validation studies are performed on fortified blank matrix, the method’s trueness contributes to the total measurement uncertainty by design. The within laboratory reproducibility can therefore be taken as a good estimate of the total measurement uncertainty, if all relevant factors were taken into account during the validation study”.

En el REC 2021/808 la incertidumbre se utiliza para el cálculo de las concentraciones críticas (CC α entre ellas). Cada laboratorio debe conocer la incertidumbre de sus métodos aplicando su procedimiento interno.

4.9. LÍMITE DE DECISIÓN PARA CONFIRMACIÓN –CC α - (punto 2.6 del REC 2021/808).

La situación será diferente según el método de establecimiento de CC α utilizado:

Si los CC α de la validación según DC 2002/657 han sido establecidos según la ISO 11843 (método de la recta de calibrado), éstos seguirán siendo válidos. En el caso de sustancias prohibidas o no autorizadas, los CC α deberán cumplir además:

- Ser \leq RPA en vigor
- Deberían ser $<$ MMPR (recomendación, no obligación –de momento-)
- Deben verificarse mediante adición experimental a muestras blanco (el REC 2021/808 no especifica cómo hacerlo).

Si los CC α de la validación según DC 2002/657 han sido establecidos por otro método diferente a la recta de calibrado, será necesario volver a calcular el CC α , siguiendo alguno de los métodos que incluye el REC 2021/808.

Por ejemplo:

- A) Según el método 3 para sustancias prohibidas o no autorizadas (2.6.1.c), se calculará el CC α utilizando la siguiente expresión:

$$CC\alpha = NMC + k (\text{unilateral, 99 \%}) \times \text{incertidumbre estándar (combinada) de medida al NMC}$$

NMC: podría asimilarse al nivel de concentración más bajo validado según DC 2002/657/CE o bien, al nivel al que se ha extendido la validación en el proceso de adaptación para cumplir el RPA o MMPR.

k = 2.33

Incertidumbre estándar (combinada) de medida: la calculará cada laboratorio siguiendo su procedimiento habitual.

- B) Según el método 2 para sustancias autorizadas (2.6.2.a.ii), se calculará el CC α utilizando la siguiente expresión:

$$CC\alpha = LMR (\text{o CM}) + k (\text{unilateral, 95 \%}) \times \text{incertidumbre estándar (combinada) de medida al LMR (o CM)}$$

LMR (o CM): Límites fijados en la legislación

k = 1.64

Incertidumbre estándar (combinada) de medida: la calculará cada laboratorio siguiendo su procedimiento habitual.

4.10. ROBUSTEZ (punto 2.4 del REC 2021/808)

En general, los requisitos continúan siendo los mismos. Se considera que no es necesario realizar ningún estudio adicional ya que se trata de métodos que se llevan tiempo utilizando y de los que existe por tanto, además de la validación según DC 2002/657, un histórico de controles de calidad de la serie de trabajo, participación en PT, etc. Solo en el caso de que se introduzcan cambios menores en el método sería necesario realizar estudios adicionales de robustez según el nuevo Reglamento.

4.11. CURVAS DE CALIBRACIÓN (punto 2.8 del REC 2021/808)

Criterios equivalentes a la DC 2002/657/CE.

Sólo en el caso de que haya sido necesario extender la validación para ampliar el rango de cuantificación por cambio en la situación legal, se deberá estudiar este parámetro en el proceso de adaptación.

4.12. RECUPERACIÓN ABSOLUTA (punto 2.9 del REC 2021/808)

En la mayoría de los métodos LC-MS/MS, en los que se utilizan patrones internos y calibración en matriz, no hay que estudiar esta característica de funcionamiento.

4.13. EFECTO MATRIZ RELATIVO (punto 2.10 del REC 2021/808)

Se debe realizar un estudio de efecto matriz relativo para tener conocimiento del comportamiento del método dentro del alcance validado.

Será suficiente con estudiar el efecto matriz relativo en 20 extractos de muestras blanco representativas del alcance del método. Los CV % no superarán el 20 % para que el método se considere válido.

Así por ejemplo, un estudio de efecto matriz relativo en músculo podría basarse en el análisis de 5 músculos porcino, 5 músculos ave, 5 músculos ovino y 5 músculo bovino. Los CV % obtenidos para cada especie y para la totalidad, darán idea de cómo se debe usar el método (si hay que hacer la calibración en matriz de la misma especie que las muestras a analizar, etc.). En definitiva, se trata de reforzar lo que ya se sabe. Si los CV para la misma especie fueran superiores al 20 %, el método podría no ser validado para esa especie y se recomienda realizar más experimentos $n \geq 20$ para desestimar una especie o matriz.

5. INFORME DE VALIDACIÓN REC 2021/808

Finalmente, se elaborará un nuevo informe de validación acorde al REC 2021/808 que sustituya al informe anterior según DC 2002/657/CE. Se excluirán del alcance del método aquellos analitos/matrices/especies/etc. que no hayan cumplido los criterios fijados en esta guía.

Podría darse el caso de que el método no cumpliera con alguno de los requisitos establecidos en el REC 2021/808 por lo que antes de excluir algún analito del alcance, se podrían realizar modificaciones en el método. Si son modificaciones menores, bastaría con un estudio de robustez o bien con una verificación de que el método continúa funcionando en la “zona de decisión”. Si por el contrario se trata de modificaciones mayores, sí habría que realizar una validación conforme a REC 2021/808.

6. REFERENCIAS

- (1) Reglamento EU 37/2010 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación con respecto a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.
- (2) Reglamento 124/2009 que establece el contenido máximo de coccidiostáticos e histomonostatos presentes en alimentos como consecuencia de transferencia inevitable.
- (3) Reglamento EU 2019/1871 relativo a valores de referencia para sustancias farmacológicamente activas no autorizadas presentes en los alimentos de origen animal.
- (4) Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPR) for Specific Pharmacologically Active Substances in Specific Animal Matrices”. Version 2.0 June 2022.