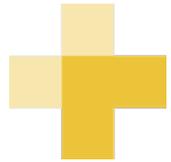


Nos aseguramos de que
su **confianza** en los
productos y servicios
esté justificada



Nuevos criterios de validación en Ensayos Microbiológicos y de Residuos Veterinarios

CNA. Jornadas de Referencia 2022

Juan Ángel García (Dpto. Agroalimentario y BPL. ENAC)

Madrid, 15 de junio de 2022



VALIDACION ENSAYOS MICROBIOLOGÍA DE LA CADENA ALIMENTARIA

ACREDITACIÓN UNEN ISO 17025

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLOGÍA DE LA CADENA ALIMENTARIA

- ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL
- CRITERIOS DE VALIDACIÓN SERIE DE NORMAS ISO 16140
- NUEVO OCEA-ENAC-20 Y PLAN DE TRANSICIÓN

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: ANTECEDENTES

HASTA 2007...”VALIDACIÓN QUÍMICA”

Apdo. 4 G-ENAC-04 Validación de métodos ensayo

- 4.2 Los métodos de ensayo microbiológicos **cuantitativos**, tales como los que el resultado se expresa en términos de detectado/no detectado, y los procedimientos de confirmación e identificación, **deben ser validados** estimando, cuando sea apropiado, su especificidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, límite de detección, efecto matricial, repetibilidad y reproducibilidad (véase en el Anexo I las definiciones).
- 4.3 En el caso de ensayos microbiológicos **cuantitativos**, debe considerarse la especificidad, sensibilidad, exactitud relativa, desviación positiva, desviación negativa, repetibilidad, reproducibilidad y el límite de cuantificación dentro de una variabilidad establecida y, en caso necesario, determinar cuantitativamente estos parámetros. Las diferencias debidas a las matrices deben tenerse en cuenta al analizar diferentes tipos de muestras. Los resultados deben evaluarse utilizando métodos estadísticos apropiados.



G-ENAC-04
Rev.3 Noviembre 2002
Hoja 1 de 18

GUIA PARA LA ACREDITACIÓN
DE LABORATORIOS QUE
REALIZAN ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICOS

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: ANTECEDENTES

Apdo. 4 G-ENAC-04.. **Problemas**

- Cada laboratorio debía validar sus métodos de ensayo microbiológicos
- No establecía diferenciación entre verificación y validación
- Establecía exigencias de validación muy rigurosas al requerir parámetros de validación como especificidad, sensibilidad
- No todos los parámetros requeridos tenían sentido en el caso de métodos normalizados
- Se requerían parámetros de validación “dudosos”, ej. límite de cuantificación en métodos cuantitativos o repetibilidad y reproducibilidad en métodos cualitativos ...
- No se establecía como llevar a cabo las actividades de validación aun cuando se trataba de una guía (ej. selección de muestras, n° de análisis ..)
- No incluía criterios de aceptación y rechazo para evaluar resultados

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SITUACIÓN ACTUAL

Cláusula 7.2 de ~~UNE~~ EN ISO/IEC 17025:2017 Selección, verificación y validación de métodos

- 7.2.1 Selección del método de ensayo: el laboratorio debe usar métodos apropiados

¿Cuáles pueden ser? → Anexo CGA-ENAC-LEC

- ✓ Métodos normalizados (ej. normas de ensayo UNE, ISO, métodos alternativos)
- ✓ Métodos internos basados en métodos normalizados⁽¹⁾
- ✓ Métodos internos

“ENFOQUE NT32”

(1) En Microbiología hay poco margen para introducir modificaciones en un método normalizado

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SITUACIÓN ACTUAL

Cláusula 7.2 de UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 Selección, verificación y validación de métodos

- **7.2.1.5 Verificación del método de ensayo:** el laboratorio debe verificar que los métodos [normalizados] logran el funcionamiento requerido
- **7.2.2.1 Validación del método de ensayo:** el laboratorio debe **validar** los métodos no normalizados, métodos desarrollados, métodos normalizados modificados o utilizados fuera de su alcance

Demostración de su validez → Anexo CGA-ENAC-LEC

“ENFOQUE NT32”

✓ Métodos normalizados

✓ Métodos internos basados en métodos normalizados

✓ Métodos internos



VERIFICACIÓN

VALIDACIÓN

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SITUACIÓN ACTUAL

Apdo. 3 de CEA-ENAC-20 (antes NT-32)

Características de funcionamiento de los métodos de ensayo

- 3.1 Métodos normalizados y basados en método normalizados

Métodos cuantitativos

✓ Recuperación (vs. valores de referencia)

✓ Precisión (intra lab)

Métodos cuantitativos

✓ Límite de detección

- 3.2 Métodos internos

✓ Disponer de evidencias completas de que han sido validados } **VALIDACIÓN**

} **VERIFICACIÓN**

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SITUACIÓN ACTUAL

Apdo. 3 CEA-ENAC-20.. **Problemas**

- Aunque establece diferenciación entre verificación y validación no hay una sistemática establecida para llevar a cabo dichas actividades, por ej.
 - Selección de matrices representativas adecuadas al alcance del método
 - Niveles de inoculación
 - Diseño de las pruebas
 - ...
- No hay criterios A/R para evaluar los resultados
- Los parámetros a verificar/validar no están suficientemente descritos

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16140



Norma Española
UNE-EN ISO 16140-3
Diciembre 2021
Versión corregida, Enero 2022

Microbiología de la cadena alimentaria

Validación de métodos

Parte 3: Protocolo para la verificación en un único laboratorio de métodos de referencia y de métodos alternativos validados

(ISO 16140-3:2021)

Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico CTN 34 *Productos alimentarios*, cuya secretaría desempeña FIAB.



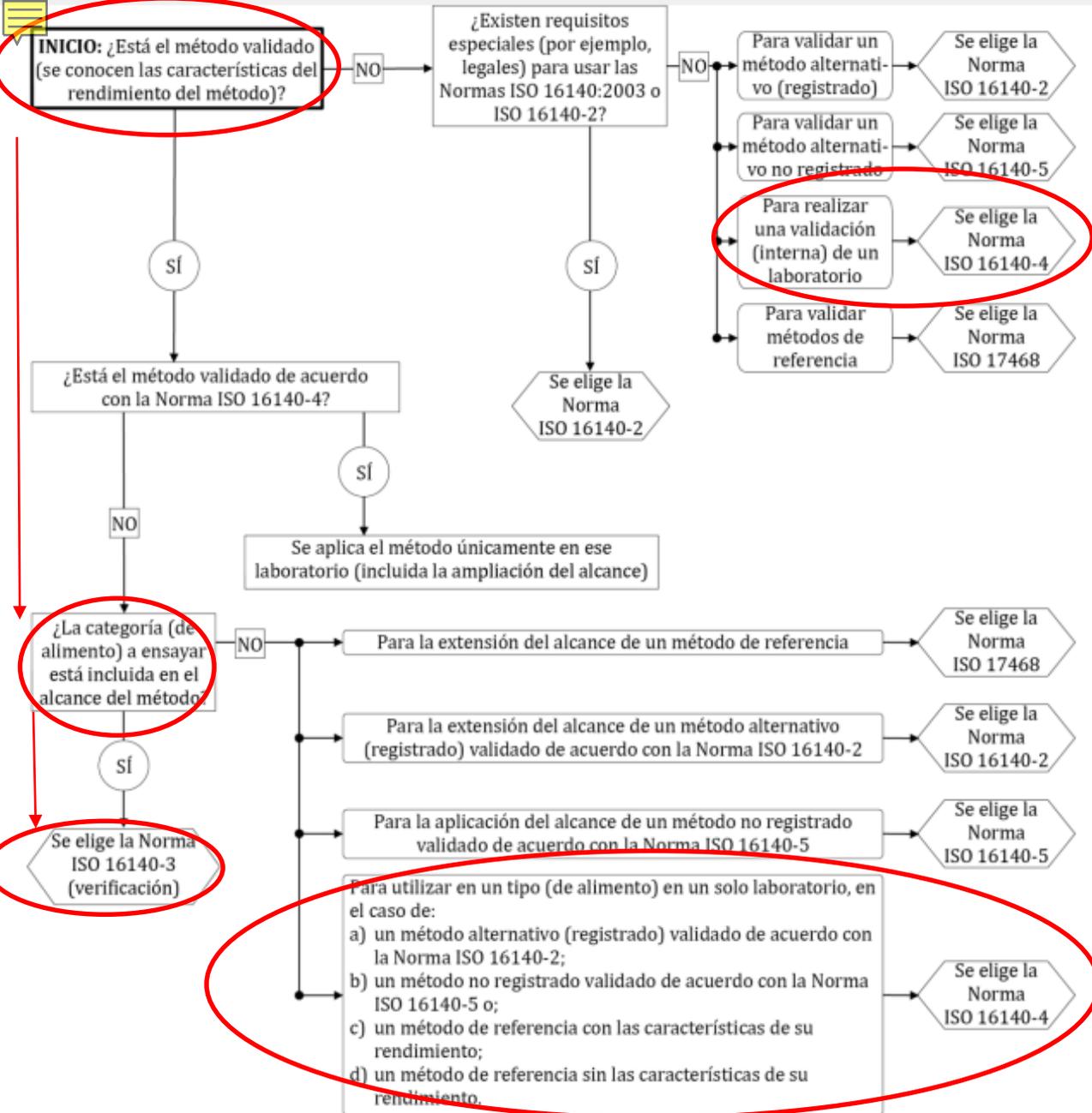
Norma Española
UNE-EN ISO 16140-4
Septiembre 2021

Microbiología de la cadena alimentaria

Validación de métodos

Parte 4: Protocolo para la validación de métodos internos de un laboratorio
(ISO 16140-4:2020)

Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico CTN 34 *Productos alimentarios*, cuya secretaría desempeña FIAB.



VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

MÉTODOS NORMALIZADOS EN MICROBIOLOGÍA según Anexo CGA-ENAG-LEC

➤ MÉTODOS DE REFERENCIA

(normas de ensayo ISO en aplicación Reg. 2073/2005)

➤ MÉTODOS ALTERNATIVOS

(patentados, normalmente métodos “rápidos”)

MÉTODOS
VALIDADOS

UNE
Normalización Española

Norma Española
UNE-EN ISO 17468
Marzo 2017

norma
española

UNE-EN ISO 16140-2

Microbiología de la cadena alimentaria

Requisitos técnicos y recomendaciones para el desarrollo o la revisión de métodos de referencia normalizados

(ISO 17468:2016)

Esta norma ha sido elaborada por el comité técnico CTN 34 Productos alimentarios, cuya secretaría desempeña FIAB.

Diciembre 2016

TÍTULO

Microbiología de la cadena alimentaria

Validación de métodos

Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) frente a los métodos de referencia

(ISO 16140-2:2016)

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

VALIDACIÓN MÉTODOS DE REFERENCIA Y MÉTODOS ALTERNATIVOS

¿En qué consiste?

MÉTODOS CUALITATIVOS (Ej. Detección Patógenos)

- **SENSIBILIDAD**(intra-lab)
- **NIVEL DE DETECCIÓN**(intra-lab)
- **INCLUSIVIDAD/EXCLUSIVIDAD**
(intra-lab)
- **SENSIBILIDAD**(inter-lab)

MÉTODOS CUANTITATIVOS (Ej. Recuento Indicadores)

- **VERACIDAD RELATIVA**(intra-lab)
- **PERFIL DE EXACTITUD**(intra-lab)
- **INCLUSIVIDAD/EXCLUSIVIDAD**
(intra-lab)
- **SENSIBILIDAD**(inter-lab)

En Métodos de Referencia las características de rendimiento se evalúan de acuerdo a ISO 16140-2 si bien se suele emplear Material de Referencia para evaluarlas y no siempre se completa la validación con un interlaboratorio (es obligatorio en detección de patógenos) Por otra parte, no todos los Métodos de Referencia están validados a día de hoy

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16140

VALIDACIÓN MÉTODOS DE REFERENCIA Y MÉTODOS ALTERNATIVOS

- Se aplican criterios de selección de matrices representativas del alcance del método (ej. para un alcance **Alimentos** se validan **5 Categorías** diferentes de un total de 15 Categorías (Anexo II de ISO 16140-2) y, normalmente, **varios Tipos de matrices** dentro de cada Categoría)
- Se realiza un número de análisis muy elevado que garantiza la fiabilidad de los resultados (suele ser mayor en Métodos alternativos) Por ejemplo:

Parámetro Validación	Método cualitativo	Parámetro Validación	Método cuantitativo
Sensibilidad intra-lab	5 Categorías x 3 Tipos TOTAL: 300 muestras	Veracidad Relativa intra-lab	5 Categorías x 3 Tipos TOTAL: 75 muestras
Nivel de detección intra-lab	5 Categorías x 1 Tipo x 3 niveles de contaminación TOTAL: 150 muestras	Perfil de exactitud intra-lab	5 Categorías x 1 Tipo x 3 niveles de contaminación TOTAL: 150 muestras
		Precisión inter-lab	8 labs x 1 Categoría x 1 Tipo x 3 niveles de contaminación TOTAL: 48 muestras
INCLUSIVIDAD/EXCLUSIVIDAD intra-lab (sin matriz) 50 cepas mo. diana y 30 cepas mo. no diana			

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

VERIFICACIÓN vs. VALIDACIÓN

ISO 16140-1 VOCABULARIO

2.81 validación:

Establecimiento de las características de comportamiento de un método y provisión de evidencia objetiva que demuestre que se cumplen los requisitos de comportamiento para un uso previsto definido.

Métodos de referencia
Métodos alternativos



INTERLABORATORIO

MÉTODOS VALIDADOS

LÍMITES
ACEPTABILIDAD

2.83 verificación:

Demostración de que un método validado utilizado por un usuario funciona conforme a las especificaciones del método determinadas en el estudio de *validación* (2.81) y que resulta adecuado para sus objetivos.

UNE-EN ISO 16140-3



UNICO LABORATORIO o LABORATORIO USUARIO

LA VERIFICACIÓN SE APLICA A MÉTODOS DE REFERENCIA Y MÉTODOS ALTERNATIVOS



!!! ESTE PLANTEAMIENTO CUMPLE A LA PERFECCIONEL REQUISITO 7.2.1.5 DE LA NORMA UNE-EN ISO/IEC 17025 !!!

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

ISO 16140-3 APLICACIÓN

ETAPA 1: VERIFICACIÓN NIMPLANTACIÓN

ETAPA 2: VERIFICACIÓN NDE MATRICES

Criterios de selección de matrices en cuanto a alcance, tipología y número mínimo

Alcance de la validación	Número de muestras		
	Verificación de la implementación	Verificación de artículos (alimentarios)	Total
Alcance de una "gama amplia de alimentos" ≥ 5 categorías de alimentos	1	≥ 5	≥ 6
Alcance de una "gama limitada de alimentos" categorías N_{alimento}	1	$N_{\text{alimento}} \leq 4$	$(N_{\text{alimento}} + 1) \leq 5$
Alcance de una "gama amplia de alimentos" + otras categorías (N_{otras})	1	≥ 5 artículos alimentarios + 1 artículo por cada una de las N_{otras} otras categorías	$\geq 6 + N_{\text{otras}}$
Alcance de una "gama limitada de alimentos" Categorías N_{alimento} + otras categorías (N_{otras})	1	$N_{\text{alimento}} \leq 4$ + artículo por cada una de las N_{otras} otras categorías	$(N_{\text{alimento}} + N_{\text{otras}} + 1) \leq 8$
Alcance solo para otras categorías (N_{otras})	1	$N_{\text{otras}} \leq 3$	$(N_{\text{otras}} + 1) \leq 4$

Verificación de matrices (Etapa 2)

- El número de matrices dependerá del alcance del laboratorio para el método
- Se seleccionan matrices "difíciles" de cada Categoría (Anexo B ISO 16140-3)

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

ISO 16140-3 APLICACIÓN

Características de Rendimiento: son los parámetros que se determinarán en la verificación

Método	Características de rendimiento	Verificación de la implementación	Verificación de artículos (alimentarios)
Cualitativo	LOD ₅₀ estimado (eLOD ₅₀)	✓	✓
Cuantitativo	Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR})	✓	No aplica
	Desviación estimada (eBias)	No aplica	✓

- **Métodos cualitativos** : es necesario verificar el Límite de Detección (como $eLOD_{50}$)
- **Métodos cuantitativos** : es necesario verificar precisión intralaboratorio y desviación estimada (diferencia entre el valor asignado y el promedio de resultados del método calculada de acuerdo al protocolo que establece ISO 16140-3 Apdo. 6; dado que el n° de replicados será bajo es “estimada”)

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

ISO 16140-3 APLICACIÓN

Protocolos de verificación

Método	Carac.	Implementación	Verificación matrices
Método Cualitativo	Prot. 3	1 matriz x 7 replicas 3-5 ufc/muestra	5 matrices x 7 replicas 3-5 ufc/muestra
	Prot. 1 $eLOD_{50}$	1 matriz x 9 replicas ($9 \times LOD_{50}$; $3 \times LOD_{50}$; $1 \times LOD_{50}$)	5 matriz x 9 replicas ($9 \times LOD_{50}$; $3 \times LOD_{50}$; $1 \times LOD_{50}$)
Método Cuantitativo	S_{IR}	1 matriz x 10 muestras x duplicado	No aplicable
	Sesgo	No aplicable	5 matrices x 3 niveles x duplicado

➤ Métodos cualitativos :

Hay hasta 3 protocolos para obtener $eLOD_{50}$ (se conocen como protocolo 1, protocolo 2 y protocolo 3 y se dispone de criterios para seleccionar uno u otro) El número de muestras varía ligeramente entre cada protocolo ($8 \leq n \leq 10$). Se aplica tanto en implantación como en verificación de matrices

➤ Métodos cuantitativos :

- Precisión intermedia: solo implantación . Los ensayos son por duplicado en condiciones diferentes
- Sesgo ($eBias$): solo en verificación de matrices, en 3 niveles de concentración y los ensayos se realizan por duplicado

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

ISO 16140-3 APLICACIÓN

Límites de aceptabilidad (AL)

Método	Características de rendimiento	Límites de aceptabilidad
Método Cualitativo	eLOD ₅₀	Para los protocolos 1 y 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 × LOD ₅₀ Para el protocolo 3: ≥ 6 de 7 resultados positivos
Método Cuantitativo	S _{IR}	S _{IR} ≤ 2 × valor medio más bajo de S _R ^a determinado durante el estudio de validación
	eBias	log ₁₀ ufc/ml (inóculo) - promedio log ₁₀ ufc/porción para análisis (artículo [alimentario] contaminado artificialmente) ≤ 0,5 log ₁₀ para cada uno de los niveles de inoculación

- Se utilizan para evaluar los resultados de la verificación (sin realizar una evaluación estadística)
- Se basan en datos procedentes de la validación del método de referencia o alternativo o, si es necesario en la opinión de expertos.

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

ISO 16140-3 APLICACIÓN

Ejemplo para estimar el nº de muestras a analizar en una verificación interna por laboratorio usuario

Método de referencia: Norma de ensayo ISO
Detección patógeno (cualitativo) para Alimentos
(=Alcance laboratorio)

- Parámetro a verificar : $eLOD_{50}$

- Implementación :

Protocolo 1: 1 matriz x 9 muestras (3 niveles) + 1 blanco

Protocolo 3: 1 matriz x 7 muestras (1 nivel 3 ufc a 5 ufc) + 1 blanco

- Verificación matrices :

Protocolo 1: 5 matrices “difíciles” x 9 muestras

Protocolo 3: 5 matrices “difíciles” x 7 muestras

≥4:55 muestras (puede aumentar)

Método de referencia: Norma de ensayo ISO
Recuento mo. indicador (cuantitativo) para Alimentos (=Alcance laboratorio)

- Implementación :

Parámetro a verificar : *precisión intralab* S_{IR}

1 matriz x 10 muestras (3 niveles) x duplicado

- Verificación matrices :

Parámetro a verificar : *sesgo* ($eBias$)

5 matrices “difíciles” x 3 niveles x duplicado

≥ 40 muestras (puede aumentar)

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

ISO 16140-3 APLICACIÓN

Verificación interna por laboratorio usuario de método de referencia sin validar (Anexo F)

- Solo se realiza la VERIFICACIÓN DE MATRICES ya que al no haber datos de validación disponibles no es posible realizar la verificación de la implementación pues los resultados no se pueden evaluar
- Selección de matrices: dentro del Alcance del laboratorio y del método de referencia: 1 matriz “sin dificultad” + ≤ 5 (ó $\leq 5+3$) matrices “difíciles” del resto de Categorías dentro del alcance del laboratorio
- Protocolos de verificación

Métodos cualitativos : $eLOD_{50}$

Protocolo 1: [1 matriz “sin dificultad” + ≤ 5 (ó $\leq 5+3$) matrices “difíciles”] x 9 muestras (3 niveles) + 1 blanco

Protocolo 3: [1 matriz “sin dificultad” + ≤ 5 (ó $\leq 5+3$) matrices “difíciles”] x 7 muestras (1 nivel, 3 ufc a 5 ufc)
+ 1 blanco

Límite de aceptabilidad: Protocolo 1 ($eLOD_{50} \leq 4$ ufc/porción análisis); Protocolo 3 (≥ 6 resultados +)

Métodos cuantitativos : Sesgo ($eBias$):

Protocolo : [1 matriz “sin dificultad” + ≤ 5 (ó $\leq 5+3$) matrices “difíciles”] x 3 niveles x duplicado

Límite de aceptabilidad: [\log ufc/ml inóculo – promedio \log ufc/porción análisis] $\leq 0,5 \log$

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

ISO 16140-4 APLICACIÓN **VALIDACIÓN** de métodos por un **SOLO** laboratorio

¿Cuándo aplica?

- Extensión del Alcance de validación de un método (cualitativo o cuantitativo) validado ISO 16140-2 (por ej. Extensión a una Categoría)
- Validación de un método interno
- Modificaciones de métodos existentes
(son dos situaciones frecuentes en acreditación...y no aplica Verificación...)

Características

- **LA VALIDACIÓN ES SOLO PARA EL LABORATORIO QUE LA HA REALIZADO (no hay estudio interlaboratorio)**
- Aplicable a métodos para Alimentos, Piensos, Muestras Ambientales, Muestras P.Primaria
- Se evalúan los mismos parámetros de validación que en la norma ISO 16140-2 + precisión (cuantitativos)
- **Por tanto, la carga de trabajo asociada a los protocolos de validación es comparable con estudio de validación intralab (por Lab. experto) de ISO 16140-2**

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SERIE DE NORMAS ISO 16

Conclusiones ISO 16140-3 (e ISO 16140-4)

- Establecen criterios necesarios para que cada laboratorio pueda realizar de forma adecuada la verificación y la validación de los métodos de microbiología de alimentos:
 - Clarifican las situaciones en las que aplica verificación **vs.** situaciones en las que aplica validación
 - Permiten una adecuada selección de matrices representativas para el Alcance del laboratorio
 - Determinan el Nº de pruebas a realizar
 - Determinan los Parámetros (Características de rendimiento) *eLOD eBias, precisión intralab*
 - Establecen Criterios A/R (Límites de Aceptabilidad) para evaluar los resultados
- Son de aplicación para el cumplimiento de los requisitos normativos de la UE-Reglamento 2073/2005

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SITUACIÓN ACTUAL

“Transition period for the implementation of ISO 16140 -3 *Version 2021-01-19*”

¿Qué debe saber un laboratorio usuario para aplicar correctamente ISO 16140-3 (e ISO 16140-4)?

➤ Métodos validados (métodos de referencia y métodos alternativos)

- (Apdo. 3) ¿Las verificaciones realizadas antes de ISO 16140-3 siguen siendo válidas? *Sí, los métodos ya acreditados no tienen que volver a ser verificados con ISO 16140-3*
- (Apdo. 4) ¿Si voy a implantar un nuevo método o incluir nuevos productos en uno ya implantado, tengo que realizar verificación por ISO 16140-3? *Sí, siempre que sea dentro del Alcance de validación del método de referencia o alternativo (Ampliaciones del alcance de acreditación)*
- (Apdo. 5) ¿Si se producen cambios en el método de referencia o alternativo tengo que verificar el método de acuerdo a ISO 16140-3? *Sí, pero solo si se trata de cambios técnicos relevantes (afectan a las características de rendimiento o extienden el Alcance del método)*

➤ Métodos de referencia no validados

- (Apdo. 2) ¿Si voy a implantar un método de referencia no validado puedo realizar verificación aplicando ISO 16140-3? *Sí, hasta 31/12/2027 (aplicando Anexo F)*

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SITUACIÓN ACTUAL

¿Qué propone ENAC? (I)

➤ **Modificar CEA-ENAG-22**

- Actualizar los criterios de acreditación de ENAC en línea con ISO 16140-3 (e ISO 16140-4)
- Para ello, es necesario modificar el **Apdo. 3 Características de funcionamiento de los métodos** para incluir los Ensayos de Microbiología de la Cadena Alimentaria
- Aplicar los criterios de selección de matrices, nº de pruebas, características de rendimiento y límites de aceptabilidad de ISO 16140-3 para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos
- Establecer la aplicación de ISO 16140-4 para extensiones del Alcance del laboratorio a Categorías no incluidas en el Alcance de validación del método normalizado y la validación de métodos internos no validados en línea con la norma 17025 y Anexo CGA-ENAG-LEC

VALIDACIÓN ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS: SITUACIÓN ACTUAL

¿Qué propone ENAC? (II)

➤ Establecer una transición ordenada para aplicar ISO 16140-3 en las nuevas acreditaciones de Ensayos de Microbiología de la Cadena Alimentaria

- A partir de **01/01/2023**: en las evaluaciones **Iniciales** y de **Ampliación** (Nuevos ensayos) evaluar en línea con ISO 16140-3
- En la **Solicitud** (Inicial o Ampliación) el laboratorio aportará en el campo “Documentación Adicional” el procedimiento establecido para la verificación y validación de ensayos microbiológicos de alimentos que tenga en cuenta ISO 16140-3. **Este procedimiento será evaluado por el Auditor Técnico/Experto Técnico designado.**

Nota.- En las solicitudes recibidas con anterioridad se podrán aplicar ya los criterios ISO 16140-3 si lo identifica el solicitante .

- Las **desviaciones** identificadas con respecto a ISO 16140-3 deberán resolverse en el plazo establecido en el documento NO-11 para Iniciales/Ampliación (**4 meses**)
- **Evaluar en línea con ISO 16140-4 en caso de métodos internos**



VALIDACION ENSAYOS RESIDUOS MEDICAMENTOS

ACREDITACIÓN UNEN ISO 17025

VALIDACIÓN ENSAYOS RESIDUOS MEDICAMENTOS

- ANTECEDENTES Y SITUACIÓN ACTUAL EN ENSAYOS RESIDUOS MEDICAMENTOS
- NUEVO REGLAMENTO QUE 2021/808
- PLAN DE TRANSICIÓN

VALIDACIÓN ENSAYOS RESIDUOS: ANTECEDENTES

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

► C1 de 14 de agosto de 2002 ◀

por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados

[notificada con el número C(2002) 3044]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2002/657/CE)

DESDE 2002...

➤ Anexo I Apdo. 2: Requisitos de funcionamiento de los métodos

- **Tipos de método** (Cribado, Confirmación) y criterios para la **selección del método (cromatográfico)** en función del uso previsto (ej. Cuadro 1, Métodos de confirmación)
- **Criterios de funcionamiento** que deben ser estudiados (ej. Veracidad y precisión en métodos cuantitativos cromatográficos)
- **Criterios de evaluación** que deben cumplir los parámetros de validación (ej. Métodos cuantitativos cromatográficos: Veracidad-Cuadro 2 y Precisión-Cuadro 3)
- **Requisitos de los métodos cromatográficos con detección por espectrometría de masas** (ej. Uso de patrón interno; Tolerancias en las intensidades relativas-Cuadro 4, Puntos de identificación-Cuadro 5 y 6) y otros sistemas de detección
- ...

VALIDACIÓN ENSAYOS RESIDUOS: ANTECEDENTES

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

► C1 de 14 de agosto de 2002 ◀

por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados

[notificada con el número C(2002) 3044]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2002/657/CE)

DESDE 2002...

➤ Anexo I Apdo. 3: Validación interna (un solo laboratorio)

- Características de funcionamiento que se han de determinar según el tipo de método:

Cuadro 9

Clasificación de los métodos analíticos en función de las características de funcionamiento que deben determinarse

		Límite de detección CC β	Límite de decisión CC α	Veracidad/la recuperación	Precisión	Selectividad/especificidad	Aplicabilidad/robustez/estabilidad
Métodos cualitativos	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Métodos cuantitativos	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = métodos de criba; C = métodos de confirmación; + = determinación obligatoria.

Realización de:

- Veracidad y Recuperación: N° niveles concentración y concentraciones de elección
- Estudio de Especificidad
- N° de pruebas para Repetibilidad y Reproducibilidad
- Estudio de las rectas de calibrado (met. Cuantitativos)
- Límites Ccalfa, Ccbeta...

VALIDACIÓN ENSAYOS RESIDUOS MED. VET: SITUACIÓN ACTUAL

**Acreditación Ensayos determinación residuos medicamentos veterinarios.
Opciones que pueden visualizarse en los alcances de acreditación:**

➤ **Acreditación por Método interno conforme a Decisión 2002/657/CE**

El laboratorio documenta en un procedimiento interno de ensayo el método analítico que:

- Cumple los requisitos de funcionamiento del Anexo I Apdo. 2 de la Decisión 2002/657/CE
 - Ha sido validado de acuerdo con el Anexo I Apdo. 3 de la Decisión 2002/657/CE
 - Cumple los requisitos de expresión de resultados para una interpretación armonizada
- } Art. 3
- } Art. 4

➤ **Acreditación por Método interno (con revisión)**

- El laboratorio documenta en un procedimiento interno de ensayo un método analítico que NO garantiza el cumplimiento de los Art. 3 y 4 de la Decisión 2002/657/CE y por tanto no puede utilizarse en el control oficial .
- No obstante, en las evaluaciones ENAC sí tiene en cuenta ciertos requisitos de funcionamiento de la Decisión 2002/657/CE

VALIDACIÓN ENSAYOS RESIDUOS: SITUACIÓN ACTUAL

**Acreditación Ensayos determinación residuos medicamentos veterinarios.
Opciones que pueden visualizarse en los alcances de acreditación:**

➤ **Acreditación por Método interno conforme a Decisión 2002/657/CE**

Hígado Orina de bovino y porcino	Determinación cualitativa de β-agonistas por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas (LC-MS/MS)	PNT/LSPPA/74	
		<i>Método interno conforme a Decisión 2002/657/CE</i>	
		Hígado	Orina
	<u>Brombuterol</u>	CC α=0,2 µg/kg	CC α=0,5 µg/kg
	<u>Cimaterol</u>	CC α=0,5 µg/kg	CC α=0,25 µg/kg
	<u>Clmbuterol</u>	CC α=0,5 µg/kg	CC α=0,25 µg/kg
	<u>Clenbuterol</u>	CC α=0,2 µg/kg	CC α=0,25 µg/kg
	<u>Isoxsuprina</u>	CC α=0,5 µg/kg	CC α=0,5 µg/kg
	<u>Mabuterol</u>	CC α=0,2 µg/kg	CC α=0,25 µg/kg
	<u>Magenterol</u>	CC α=0,2 µg/kg	CC α=0,25 µg/kg
	<u>Ractopamina</u>	CC α=0,5 µg/kg	CC α=0,5 µg/kg
	Salbutamol	CC α=0,5 µg/kg	CC α=0,5 µg/kg
	Terbutalina	CC α=2,0 µg/kg	CC α=1,0 µg/kg
	<u>Zileaterol</u>	CC α=0,5 µg/kg	CC α=0,25 µg/kg

Apdo. 9.1 de PAC-ENAG-LEC
Nuevo documento o nueva
revisión es una Ampliación lo
que significa que es necesaria
una evaluación

➤ **Acreditación por Método interno (con revisión)**

Orina Suero animal	Determinación cualitativa de hormonas (esteroides) por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas (LC-MS/MS) (método de confirmación)	PE-I9010 Rev. 6	
		<i>Método interno In-house method</i>	
		Orina/Urine	Suero/Serum
	<u>Nandrolona/Nandrolone</u>	(≥ 3 µg/l)	(≥ 1 µg/l)
	<u>Noretisterona/Norethisterone</u>	(≥ 3 µg/l)	(≥ 0,5 µg/l)
	<u>β-Trenbolona/B-Trenbolone</u>	(≥ 3 µg/l)	(≥ 1,5 µg/l)

relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE

- La Comisión ha agrupado en nuevo acto jurídico las disposiciones aplicables a las sustancias farmacológicamente activas (como en Micotoxinas, Dioxinas/PCB, metales pesados, HAP)
- Continúan los requisitos de funcionamiento de los métodos de análisis y de validación interna (en Capítulos 1, 2 y 4 del Anexo I). Se incluye nuevo Capítulo 4 sobre validaciones reducidas
- Se mantiene el mismo esquema de requisitos de funcionamiento y de validación que con Decisión 2002/657/CE.. pero se han producido cambios técnicos (ej. identificación, niveles de concentración, criterios de aceptabilidad de veracidad y precisión, cálculo $CC\alpha$, concepto $CC\beta$)
- Será necesario disponer de un **Análisis de cambios** del Reglamento UE 2021/808 respecto a la Decisión 2002/657/CE
 - Ya solicitado por ENACa LNRs (CNA y Santa Fe) en aplicación del documento NT-55

NUEVO REGLAMENTO UE 2021/808

VENTAJAS DE DISPONER DE UN DOCUMENTO PÚBLICO CON EL ANÁLISIS DE LOS CAMBIOS EN EL REGLAMENTO UE 2021/808 ELABORADO POR LOS LNRS

- **ENAC aceptará como suficiente el análisis de cambios (técnicos) realizado por los laboratorios de referencia, que incluya:**
 - Una identificación de los cambios y descripción de los mismos
 - Una clasificación de los cambios que identifique su relevancia y su impacto en las validaciones de acuerdo a la Decisión 2002/657/CE
 - Una identificación de los aspectos en los que sería necesario ajustar las validaciones internas.
 - Información/consideraciones sobre conceptos, selección de niveles de interés, nº de pruebas a realizar etc en modo similar a la Comunicación de Laboratorio nº 112 que estableció los criterios mínimos necesarios para realizar las validaciones internas de acuerdo con la Decisión 2002/657/CE
- **El documento de análisis de cambios deberá tener carácter público para cumplir con NT-55**

NUEVO REGLAMENTO UE 2021/808: PLAN DE TRANSICIÓN

ENAC PROPONDRÁ UN PLAN DE TRANSICIÓN CON LOS SIGUIENTES HITOS:

- **FECHALÍMITE: 10/06/2026** (a partir de esa fecha todas las acreditaciones deberán ser Conforme al Reglamento UE2021/808 o por método interno con estado de revisión en el Anexo Técnico)
- **NUEVOSENSAYOS(NO ACREDITADOS)**
 - A partir de 01/07/2022 no se admiten solicitudes (Iniciales, Ampliación) de ensayos de residuos de sustancias farmacológicamente activas conforme a la Decisión 2002/657/CE
 - Desde esa fecha solo se evalúa Conforme al Reglamento UE2021/808
- **ENSAYOSACREDITADOS**
 - Antes del 10/12/2025 los laboratorios acreditados con métodos internos conforme a la Decisión 2002/657/CE tienen que solicitar ser evaluados conforme al Reglamento UE2021/808 (mediante el envío de una **Solicitud de Ampliación**)
- **PLAZO RESOLUCIÓN DESVIACIONES 4 MESES (TABLA I NO-11 PLAZOS RESPUESTA) y A)**
- **En DOCUMENTACIÓN ADICIONAL de e-Solicitud se aportará el Procedimiento de validación**
- **SIEMPRE QUE SEA POSIBLE SE REALIZARÁ UNA EVALUACIÓN DOCUMENTAL**

NUEVO REGLAMENTO UE 2021/808

PLAN DE TRANSICIÓN: ALCANCE FLEXIBLE

➤ ENSAYOS INCLUIDOS EN LEBA:

- Antes de **10/12/2025** los laboratorios acreditados por Categoría de ensayos con métodos internos conforme a la Decisión 2002/657/CE tienen que ser evaluados conforme al Reglamento UE 2021/808.
- La evaluación se hará en una auditoría de mantenimiento planificada, previo aviso del laboratorio con una antelación de al menos **4 meses**.

➤ ENSAYOS NO INCLUIDOS EN LEBA:

- A partir del **1 de julio de 2022** la inclusión de nuevos ensayos en la LEBA solo podrá realizarse de acuerdo con los requisitos del Reglamento UE 2021/808.
- La evaluación se realizará en la siguiente auditoría de mantenimiento, previa identificación del cambio por parte del laboratorio al Responsable del expediente y al Equipo Auditor

➤ PLAZO RESOLUCIÓN DE SVIACIONES **1 mes** (TABLA I NO-11 PLAZOS RESPUESTAS y R)

➤ EVALUACIÓN IN SITU

¡¡¡¡¡GRACIAS!