

Programa sesión de Zoosanitarios

- Novedades legislativas en el control oficial de residuos de medicamentos veterinarios y otras sustancias.
Carlos Bellón (SDG de Control Oficial y Alertas. AESAN)
- Novedades en el análisis de residuos de medicamentos veterinarios. Actividades de referencia.
Patricia Muñoz. CNA
- Validación de un método de análisis de quinolonas en músculo por LC-MS/MS según REC 2021/808.
Rocío Jiménez. CNA



NOVEDADES EN EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS Y ACTIVIDADES DE REFERENCIA

Patricia Muñoz
Servicio de Zoosanitarios. CNA

Nueva clasificación de sustancias en el PNIR

ANEXO I

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2022/1644 DE LA COMISIÓN 7 de julio de 2022 (publicado el 26/09/22)

Grupo A: Sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas

1. Sustancias prohibidas por la Directiva 96/22/CE

- a) Estilbenos
- b) Tireostáticos
- c) Esteroides
- d) Lactonas del ácido resorcílico (RALs)
- e) β -agonistas

2. Sustancias prohibidas que figuran en el cuadro 2 del Reglamento 37/2010

- a) Cloranfenicol
- b) Nitrofuranos
- c) Dimetridazol, metronidazol, rodinazol y otros nitroimidazoles
- d) Otras sustancias (dapsona, clorpromacina, colchicina...)

⇒ Grupos nuevos (no estaban incluidos en la Directiva 96/23/CE)

Nueva clasificación de sustancias en el PNIR

ANEXO I

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2022/1644 DE LA COMISIÓN 7 de julio de 2022 (publicado el 26/09/22)

Grupo A: Sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas

3. Sustancias que no figuran en el cuadro 1 del Reglamento 37/2010 o no autorizadas para piensos según Reglamento 1831/2003

- a) Tintes
- b) Productos fitosanitarios (Reglamento 1107/2009), biocidas (Reglamento 528/2012) que pueden utilizarse en la cría de animales productores de alimentos.
- c) Sustancias antimicrobianas
- d) Coccidiostáticos, histomonostatos y otros agentes antiparasitarios.
- e) Hormonas proteicas y peptídicas
- f) Sustancias antiinflamatorias, sedantes y cualquier otra sustancia farmacológicamente activa
- g) Sustancias antivíricas

⇒ Grupos nuevos (no estaban incluidos en la Directiva 96/23/CE)

Nueva clasificación de sustancias en el PNIR

ANEXO I

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2022/1644 DE LA COMISIÓN 7 de julio de 2022 (publicado el 26/09/22)

Grupo A: Sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas

3. Sustancias que no figuran en el cuadro 1 del Reglamento 37/2010 o no autorizadas para piensos según Reglamento 1831/2003

- a) Tintes *Colorantes*
- ⇒ b) Productos fitosanitarios (Reglamento 1107/2009), biocidas (Reglamento 528/2012) que pueden utilizarse en la cría de animales productores de alimentos.
- c) Sustancias antimicrobianas
- d) Coccidiostáticos, histomonostatos y otros agentes antiparasitarios.
- ⇒ e) Hormonas proteicas y peptídicas
- f) Sustancias antiinflamatorias, sedantes y cualquier otra sustancia farmacológicamente activa
- ⇒ g) Sustancias antivíricas

⇒ Grupos nuevos (no estaban incluidos en la Directiva 96/23/CE)

Nueva clasificación de sustancias en el PNIR

ANEXO I

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2022/1644 DE LA COMISIÓN 7 de julio de 2022 (publicado el 26/09/22)

Grupo A: Sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas

3. Sustancias que no figuran en el cuadro 1 del Reglamento 37/2010 o no autorizadas para piensos según Reglamento 1831/2003

a) Tintes *Colorantes*

BVL



b) **Productos fitosanitarios** (Reglamento 1107/2009), **biocidas** (Reglamento 528/2012) que pueden utilizarse en la cría de animales productores de alimentos.

c) Sustancias antimicrobianas

d) Coccidiostáticos, histomonostatos y otros agentes antiparasitarios.

WFSR



e) **Hormonas proteicas y peptídicas**

f) Sustancias antiinflamatorias, sedantes y cualquier otra sustancia farmacológicamente activa

WFSR



g) **Sustancias antivíricas**



Grupos nuevos (no estaban incluidos en la Directiva 96/23/CE)

Nueva clasificación de sustancias en el PNIR

ANEXO I

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2022/1644 DE LA COMISIÓN 7 de julio de 2022 (publicado el 26/09/22)

Grupo B: Sustancias farmacológicamente activas autorizadas para su uso en animales productores de alimentos

1. Sustancias farmacológicamente activas que figuran en el cuadro 1 del Reglamento 37/2010

- a) Sustancias antimicrobianas
- ⇒ b) **Insecticidas, fungicidas**, antihelmínticos y otros agentes antiparasitarios
- c) Tranquilizantes
- d) Antiinflamatorios no esteroideos (AINES), corticosteroides y glucocorticoides.
- e) Otras sustancias farmacológicamente activas.

2. Coccidiostáticos e histomonostatos autorizados con niveles máximos y LMR establecidos en la legislación de la Unión.

⇒ Grupos nuevos (no estaban incluidos en la Directiva 96/23/CE)

Nueva clasificación de sustancias en el PNIR

ANEXO I

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2022/1644 DE LA COMISIÓN 7 de julio de 2022 (publicado el 26/09/22)

Grupo B: Sustancias farmacológicamente activas autorizadas para su uso en animales productores de alimentos

1. Sustancias farmacológicamente activas que figuran en el cuadro 1 del Reglamento 37/2010

- a) Sustancias antimicrobianas
- b) **Insecticidas, fungicidas**, antihelmínticos y otros agentes antiparasitarios
- c) Tranquilizantes
- d) Antiinflamatorios no esteroideos (AINES), corticosteroides y glucocorticoides.
- e) Otras sustancias farmacológicamente activas.

BVL



2. Coccidiostáticos e histomonostatos autorizados con niveles máximos y LMR establecidos en la legislación de la Unión.

 Grupos nuevos (no estaban incluidos en la Directiva 96/23/CE)

Referencias del CNA (Servicio Zoonosarios)

Grupo A: prohibidas o no autorizadas

- 1a. Estilbenos
- 1c. Esteroides
- 1d. Lactonas del Ácido Resorcílico (RALs)
- 1e. β -agonistas
- 2a. Cloranfenicol
- 2b. Nitrofuranos
- 2d. Dapsona
- 3a. Colorantes
- 3c. Sustancias antimicrobianas

Publicación Reglamento
Delegado (UE) 2022/1644
de la Comisión

Grupo B: autorizadas

- 1a. Sustancias antimicrobianas
- 1d. Corticoides y glucocorticoides

Referencias del CNA (Servicio Zoosanitarios)

Grupo A: prohibidas o no autorizadas

- 1a. Estilbenos
- 1c. Esteroides
- 1d. Lactonas del Ácido Resorcílico (RALs)
- 1e. β -agonistas
- 2a. Cloranfenicol
- 2b. Nitrofuranos
- 2d. Dapsona
- 3a. Colorantes
- 3c. Sustancias antimicrobianas

Grupo B: autorizadas

- 1a. Sustancias antimicrobianas
- 1d. Corticoides y glucocorticoides

Publicación Reglamento
Delegado (UE) 2022/1644
de la Comisión



Reuniones de los LNR para el
reparto de los nuevos grupos
(último trimestre 2022):

CNA: hormonas proteicas y
peptídicas

LCSA Santa Fe: antivirales

Referencias del CNA (Servicio Zoosanitarios)

Grupo A: prohibidas o no autorizadas

- 1a. Estilbenos
- 1c. Esteroides
- 1d. Lactonas del Ácido Resorcílico (RALs)
- 1e. β -agonistas
- 2a. Cloranfenicol
- 2b. Nitrofuranos
- 2d. Dapsona
- 3a. Colorantes
- 3c. Sustancias antimicrobianas
- 3d. **Hormonas proteicas y peptídicas**

hormonas

Publicación Reglamento
Delegado (UE) 2022/1644
de la Comisión



Reuniones de los LNR para el
reparto de los nuevos grupos
(último trimestre 2022):

**CNA: hormonas proteicas y
peptídicas**

LCSA Santa Fe: antivirales

Grupo B: autorizadas

- 1a. Sustancias antimicrobianas
- 1d. Corticoides y glucocorticoides

Referencias del CNA (Servicio Zoosanitarios)

Grupo A: prohibidas o no autorizadas

- 1a. Estilbenos
- 1c. Esteroides
- 1d. Lactonas del Ácido Resorcílico (RALs)
- 1e. β -agonistas
- 2a. Cloranfenicol
- 2b. Nitrofuranos
- 2d. Dapsona
- 3a. Colorantes
- 3c. Sustancias antimicrobianas
- 3e. **Hormonas proteicas y peptídicas**

Grupo B: autorizadas

- 1a. Sustancias antimicrobianas
- 1d. Corticoides y glucocorticoides

CATÁLOGO EFSA:

- Somatotropina porcina
- Somatotropina bovina
- Somatotropina humana
- Somatosalm (somatotropina trucha arcoiris)

EURL WFSR:

- Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1 y IGF-2)
- Somatotropina bovina (bST) y rbST.
- Miostatina e inhibidores de miostatina

Referencias del CNA (Servicio Zoosanitarios)

Grupo A: prohibidas o no autorizadas

- 1a. Estilbenos
- 1c. Esteroides
- 1d. Lactonas del Ácido Resorcílico (RALs)
- 1e. β -agonistas
- 2a. Cloranfenicol
- 2b. Nitrofuranos
- 2d. Dapsona
- 3a. Colorantes
- 3c. **Sustancias antimicrobianas**
- 3e. Hormonas proteicas y peptídicas

Grupo B: autorizadas

- 1a. Sustancias antimicrobianas
- 1d. Corticoides y glucocorticoides

CATÁLOGO EFSA:

Carbadox, etc.
Fumagilina
Quinolonas no autorizadas
Macrólidos no autorizados
Tetraciclinas no autorizadas
Aminoglucósidos no autorizados
Carbapenémicos
...

(Antimicrobianos sin LMR para ninguna combinación de analito / matriz)

¿Directrices sobre las nuevas sustancias?

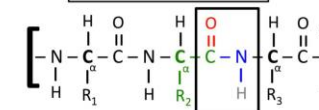
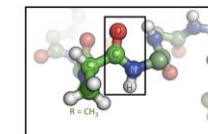
- GUIA EURL MMPR (versión 2.0 junio 2022):
 - Clasificación de sustancias antigua
 - No incluye por tanto los nuevos grupos
 - Aún no hay directrices (compuestos, matrices ni MMPR) para las “nuevas sustancias”.
- EURL workshops de los últimos años:

Empiezan a hablar de estas sustancias (de las hormonas proteicas –sobre todo de la somatotropina)

Hormonas proteicas y peptídicas

Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1 y IGF-2):

- Son hormonas endógenas producidas por el hígado.
- Posibles biomarcadores para detectar una administración de hormona del crecimiento (GH).
- Se especula sobre el uso de IGFs para aumentar la masa muscular en producción animal.
- Pueden producirse también como consecuencia de enfermedades (cáncer o relacionadas con la GH)
- Hay IGF-1 sintéticos con efectos más potentes que los IGF-1 endógenos.



Resultados positivos de sustancias endógenas siempre son más problemáticos de interpretar que los positivos de sustancias sintéticas/no endógenas.

Hormonas proteicas y peptídicas

Factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-1 y IGF-2):

COMPOUND	AMINOACID SEQUENCE
IGF-1 human/pig/horse/bovine	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSS RRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPASA

IGF-1 (mass = 7649 Da)

COMPOUND	AMINOACID SEQUENCE
IGF-2 human	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAASRVSRRRSRGIVEECCFRSCDLAL LETYCATPAKSE
IGF-2 pig	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAASRNSRRSRGIVEECCFRSCDLAL LETYCATPAKSE
IGF-2 horse	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPAASRINRRSRGIVEECCFRSCDLALL ETYCATPAKSE
IGF-2 bovine	AYRPSETLCGGELVDTLQFVCGDRGFYFSRPSRINRRSRGIVEECCFRSCDLALL ETYCATPAKSE

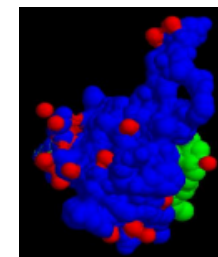
IGF-2 (mass=7527 Da)

- Niveles muy bajos en orina (pg/ml). Mejor analizar plasma o suero (ng/ml)
- Se pueden analizar por LC-MS/MS (previa fragmentación).

Hormonas proteicas y peptídicas

La hormona del crecimiento (GH) o somatotropina (ST):

- Secretada por la glándula pituitaria anterior.
- Importante papel en el crecimiento y la reproducción.
- Aumenta la masa muscular y disminuye la grasa (efecto anabolizante); incrementa la producción de leche. También aumenta el crecimiento de huesos.
- En USA: uso autorizado de rbST –bST recombinante- desarrollada por Monsanto:
 - ↳ Efectos negativos en la salud animal: mastitis, disminución de la fertilidad, aumento de cojera y otros problemas en extremidades etc.



Hormonas proteicas y peptídicas

- bST: formada por 191 aminoácidos (22kDa)

COMPOUND	AMINOACID SEQUENCE	
bST bovine	A FPAMSLSGLFANAVLRAQHLHQLAADTFKEFER TYIEGQRYSIQNTQVAFCFSETIPAPTGKNEAQQKSDLELLRI SLLLIQSWLGPLQFLSRVFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGILA LMRELEDGTPRAGQILKQTYDKFDTNMRSDDALLKNYGLLSC FRKDLHKTETYLRVMKRRFGEASCAF	bST (mass=21812 Da)
rbST - Posilac	M FPAMSLSGLFANAVLRAQHLHQLAADTFKEFER TYIEGQRYSIQNTQVAFCFSETIPAPTGKNEAQQKSDLELLRI SLLLIQSWLGPLQFLSRVFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGILA LMRELEDGTPRAGQILKQTYDKFDTNMRSDDALLKNYGLLSC FRKDLHKTETYLRVMKRRFGEASCAF	bST (mass=21872 Da)

rbST: se modifica una A por M

- Leche fácil de muestrear, pero concentraciones bajas < 1ng/ml
- Plasma/suero: concentraciones mayores >10 ng/ml
- Inmunofinidad + LC-MS/MS (MRM): muy buenos resultados para confirmación de rbST en suero

PARTICIPACIÓN EN WORKSHOPS LR-UE

- BVL (Berlín) mayo 2022 CL N° 673
- ANSES (Fougeres) junio 2022 CL N° 679
- WFSR (Wageningen) noviembre 2022 CL N° 678
- BVL (Berlín) mayo 2023 CL N° 697
- ANSES (Fougeres) junio 2023
- WFSR (Wageningen) otoño 2023



Actividades de los LR-UE

EURLs for Residues of Veterinary Medicinal Products

HOME EURL PORTAL EURL ANSES EURL BVL EURL WFSR Search

LEGISLATION
GUIDANCE DOCUMENTS
EVENTS
NETWORK
FAQ

NRL network. © OpenStreetMap contributors, License: <https://www.openstreetmap.org/copyright>

<https://eurl-residues.eu/>

- EURL PORTAL: acceso público
- EURL ANSES, BVL y WFSR: acceso restringido (limitado a LNR)



Información a través de los LNR

Actividades de los LR-UE

Guías:

- Control de calidad en rutina (“ongoing quality control”) -oct 2020- ✓
 - Extensión de métodos de confirmación cuantitativos -julio 2021- ✓
 - Validación métodos de confirmación -nov 2021- ✓
 - Guía sobre Standard Addition Method -nov 2022- ✓
 - Guía MMPRs (versión 2.0 –jun. 2022-) ✓
- Disponibles en:
* Eroom CNA
* EURL portal
- Aún pendiente la Guía EURL de validación de métodos de cribado
 - * Un nuevo borrador del documento se revisará en el workshop de ANSES 2023 (20-22 de junio, Fougères)
 - Prevista la elaboración de una guía específica sobre validación de métodos HRMS.

Actividades de los LR-UE

- EURL Reflection paper 2.0 (dic 2022)

Actualización del EURL Reflection paper del 2014

“Natural growth promoting substances in biological samples”



EURL Reflection paper 2.0:

Natural growth promoting substances in biological samples

Presence - and formation - of hormones and other growth promoting substances in food producing animals.

Current approaches for enforcement and research needs for full implementation in residue control

Disponible en:
* Eroom CNA
* EURL portal

- La elaboración de una base de datos con información sobre la **estabilidad de residuos de medicamentos veterinarios en matriz** es una prioridad (tema a tratar en el workshop de ANSES 2023).

Actividades de los LR-UE

Ensayo colaborativo multifamilia en leche organizado por el BVL (EURL Berlín):

- BVL proporciona el método (LC-MS/MS o LC-HRMS)
- Objetivo: validación por el método alternativo (BVL). Participación LNR voluntaria.
- 130 compuestos aprox.
- Familias incluidas
Corticosteroides, anfenicoles, quinolonas, lincosamidas, pleuromutilinas, macrólidos, polipéptidos, sulfonamidas, tetraciclinas, betalactámicos, AINEs y nitroimidazoles.
- El CNA participará sólo en aquellas familias para las que es LNR (UPLC-QTOF IMS recién adquirido –fondos europeos-)



UPLC-QTOF (IMS)

Reglamento Ejecución 2021/808 de la Comisión

L 180/84	ES	Diario Oficial de la Unión Europea	21.5.2021
REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2021/808 DE LA COMISIÓN de 22 de marzo de 2021 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			

- Entrada en vigor el **10 de junio de 2021**
- Hasta el **10 de junio de 2026**, los requisitos establecidos en los puntos 2 y 3 del anexo I de la **DC 2002/657** seguirán aplicándose a los métodos que hayan sido validados antes del 10 de junio de 2021.
 - Punto 2: criterios de funcionamiento
 - Punto 3: validación



Transición DC 2002/657/CE a REC 2021/808

ALCANCE validado según DC 2002/657

10/06/2021

Transición



ALCANCE validado según REC 2021/808

10/06/2026

Transición DC 2002/657/CE a REC 2021/808

ALCANCE validado según DC 2002/657

10/06/2021

Transición

Adaptación a REC 2021/808: comprobar si se cumplen los nuevos criterios y estudiar sólo lo que sea necesario

Nueva validación según REC 2021/808

ALCANCE validado según REC 2021/808

10/06/2026

Transición DC 2002/657/CE a REC 2021/808

ALCANCE validado según DC 2002/657

10/06/2021

Adaptación a REC 2021/808: comprobar si se cumplen los nuevos criterios y estudiar sólo lo que sea necesario

Guía NRL



Transición

Nueva validación según REC 2021/808

Guía NRL pendiente

ALCANCE validado según REC 2021/808

10/06/2026

Transición DC 2002/657/CE a REC 2021/808



agencia
española de
seguridad
alimentaria y
nutrición

Centro
Nacional de
Alimentación

MAPA
DIVISIÓN DE LABORATORIOS DE SANIDAD DE LA
PRODUCCIÓN AGRARIA
LABORATORIO CENTRAL DE SANIDAD ANIMAL SANTA FE

Laboratorios Nacionales de Referencia para residuos de medicamentos veterinarios

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

Ed.01 (Dic 2022)

- Documento de ayuda para los laboratorios.
- Documento de referencia en auditorias.
- Disponible en:
 - * Eroom CNA
 - * Web AESAN

Transición DC 2002/657/CE a REC 2021/808



- Objetivo principal: establecer una base común que ayude en el proceso de revaluación de validaciones realizadas según DC 2002/657/CE conforme a los requisitos del REC 2021/808
- Aplicable a validaciones convencionales de métodos LC-MS/MS de confirmación cuantitativos
- 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

Oniris
cole Nationale Nantes Atlantique
Fédération Nationale, Agroalimentaire et de l'Alimentation
Santé et alimentation au cœur de la vie

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté
Égalité
Fraternité

anses

LABERCA

SARAF
School for Advanced Residue Analysis in Food

SARAF, 8th of December

PRATICAL APPLICATIONS FROM TWO FRENCH NRLS OF THE NEW EUROPEAN REGULATION 2021/808 AND THEIR IMPLEMENTATION ON FORBIDDEN AND AUTHORIZED SUBSTANCES

E Bichon
LABERCA, Nantes

P Guichard
Anses, Fougères

COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2021/808
of 22 March 2021
on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and reporting (Devises: 2002/387/EC and 90/269/EEC)

Classification of analytical methods			
Method	Performance	Reporting	Sampling
Method A	✓	✓	✓
Method B	✓	✓	✓
Method C	✓	✓	✓
Method D	✓	✓	✓
Method E	✓	✓	✓
Method F	✓	✓	✓
Method G	✓	✓	✓
Method H	✓	✓	✓
Method I	✓	✓	✓
Method J	✓	✓	✓
Method K	✓	✓	✓
Method L	✓	✓	✓
Method M	✓	✓	✓
Method N	✓	✓	✓
Method O	✓	✓	✓
Method P	✓	✓	✓
Method Q	✓	✓	✓
Method R	✓	✓	✓
Method S	✓	✓	✓
Method T	✓	✓	✓
Method U	✓	✓	✓
Method V	✓	✓	✓
Method W	✓	✓	✓
Method X	✓	✓	✓
Method Y	✓	✓	✓
Method Z	✓	✓	✓

Reporting methods			
Method	Reporting	Sampling	Reporting
Method A	✓	✓	✓
Method B	✓	✓	✓
Method C	✓	✓	✓
Method D	✓	✓	✓
Method E	✓	✓	✓
Method F	✓	✓	✓
Method G	✓	✓	✓
Method H	✓	✓	✓
Method I	✓	✓	✓
Method J	✓	✓	✓
Method K	✓	✓	✓
Method L	✓	✓	✓
Method M	✓	✓	✓
Method N	✓	✓	✓
Method O	✓	✓	✓
Method P	✓	✓	✓
Method Q	✓	✓	✓
Method R	✓	✓	✓
Method S	✓	✓	✓
Method T	✓	✓	✓
Method U	✓	✓	✓
Method V	✓	✓	✓
Method W	✓	✓	✓
Method X	✓	✓	✓
Method Y	✓	✓	✓
Method Z	✓	✓	✓



Webinar SARAF 8/12/2022:

Presentación muy interesante con 2 ejemplos prácticos de validaciones realizadas según REC 2021/808:

- LABERCA –sustancias prohibidas-
- ANSES –sustancias autorizadas-

Próximos objetivos a destacar

- Implementación del REC 2021/808 (2 LNR):
 - Organizar más Jornadas específicas
 - Elaborar GUIA NRL para ayudar en las validaciones según REC 2021/808 (documento de mínimos que sirva de apoyo a los laboratorios)
- Organizar ensayo de intercomparación para los laboratorios control (1 o 2 en 2024)
- Retomar los cursos teórico-prácticos en el CNA (1 en 2024).

Servicio de Zoonosarios:

- Pilar Sierra Martín
- Eva Mateos del Olmo
- Javier Arteaga García
- Rocío Jiménez Mazo
- Jesús López Tapia

¡Muchas gracias equipo!





Gracias por vuestra atención

pmunozm@aesan.gob.es
zoosanitarios-cna@aesan.gob.es



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE QUINOLONAS EN MÚSCULO POR LC-MS/MS SEGÚN REC 2021/808

Rocío Jiménez
Servicio de Zoonos. CNA



¿QUÉ ANALITOS?



LABORATORY OF FOUGERES

Introduction to evaluation of EU-MS RMP 2020 - EURL-ANSES-FOUGERES (A6-B1-B2f-B3e)



Substances Group B1 – MRL-Authorised Antibiotics and including Sulfonamides and Quinolones

Case of Quinolones

The comments are based on the following criteria:

Analytes

Absolute minimum requirements: Ciprofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin, Enrofloxacin, Flumequine, Marbofloxacin, Nalidixic acid, Norfloxacin, Oxolinic acid, Sarafloxacin

Recommended: /

Optional: /

10 ANALITOS



26.9.2022 ES Diario Oficial de la Unión Europea L 248/3

REGLAMENTOS

REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2022/1644 DE LA COMISIÓN de 7 de julio de 2022

por el que se completa el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo con requisitos específicos para la realización de controles oficiales del uso de sustancias farmacológicamente activas autorizadas como medicamentos veterinarios o como aditivos de sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas y sus residuos

A3C

B1A

Grupo B – Sustancias farmacológicamente activas autorizadas para su uso en animales productores de alimentos

1. Sustancias farmacológicamente activas que figuran en el cuadro 1 del anexo del Reglamento (UE) n.º 37/2010:

- a) sustancias antimicrobianas;
- b) insecticidas, fungicidas, antihelmínticos y otros agentes antiparasitarios;
- c) sedantes;
- d) antiinflamatorios no esteroideos (AINE), corticosteroides y glucocorticoides;
- e) otras sustancias farmacológicamente activas.

2. Coccidiostatos e histomonostatos autorizados con arreglo a la legislación de la Unión, cuyos niveles máximos y límites máximos de residuos se establecen en la legislación de la Unión.

ANEXO I

Grupo A – Sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas en animales productores de alimentos

1. Sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias β-agonistas cuyo uso está prohibido en el marco de la Directiva 96/22/CE del Consejo (*):

- a) estilbenos;
- b) agentes antitiroideos;
- c) esteroides;
- d) lactonas del ácido resorcíclico (incluido el zeranol);
- e) β-agonistas.

2. Sustancias prohibidas que figuran en el cuadro 2 del anexo del Reglamento (UE) n.º 37/2010:

- a) cloranfenicol;
- b) nitrofuranos;
- c) dimetridazol, metronidazol, ronidazol y otros nitroimidazoles;
- d) otras sustancias.

3. Sustancias farmacológicamente activas que no figuran en el cuadro 1 del anexo del Reglamento (UE) n.º 37/2010 (*) o sustancias no autorizadas para su uso en piensos para animales productores de alimentos en la Unión de conformidad con el Reglamento (UE) n.º 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo (*):

- a) tintes;
- b) productos fitosanitarios, tal como se definen en el Reglamento (UE) n.º 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo (*), y biocidas, tal como se definen en el Reglamento (UE) n.º 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo (*), que pueden utilizarse en la cría de animales productores de alimentos;
- c) sustancias antimicrobianas;
- d) coccidiostatos, histomonostatos y otros agentes antiparasitarios;
- e) hormonas proteicas y peptídicas;
- f) sustancias antiinflamatorias, sedantes y cualquier otra sustancia farmacológicamente activa;
- g) sustancias antiviricas.

Reg. 37/2010: LMR MÚSCULO ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

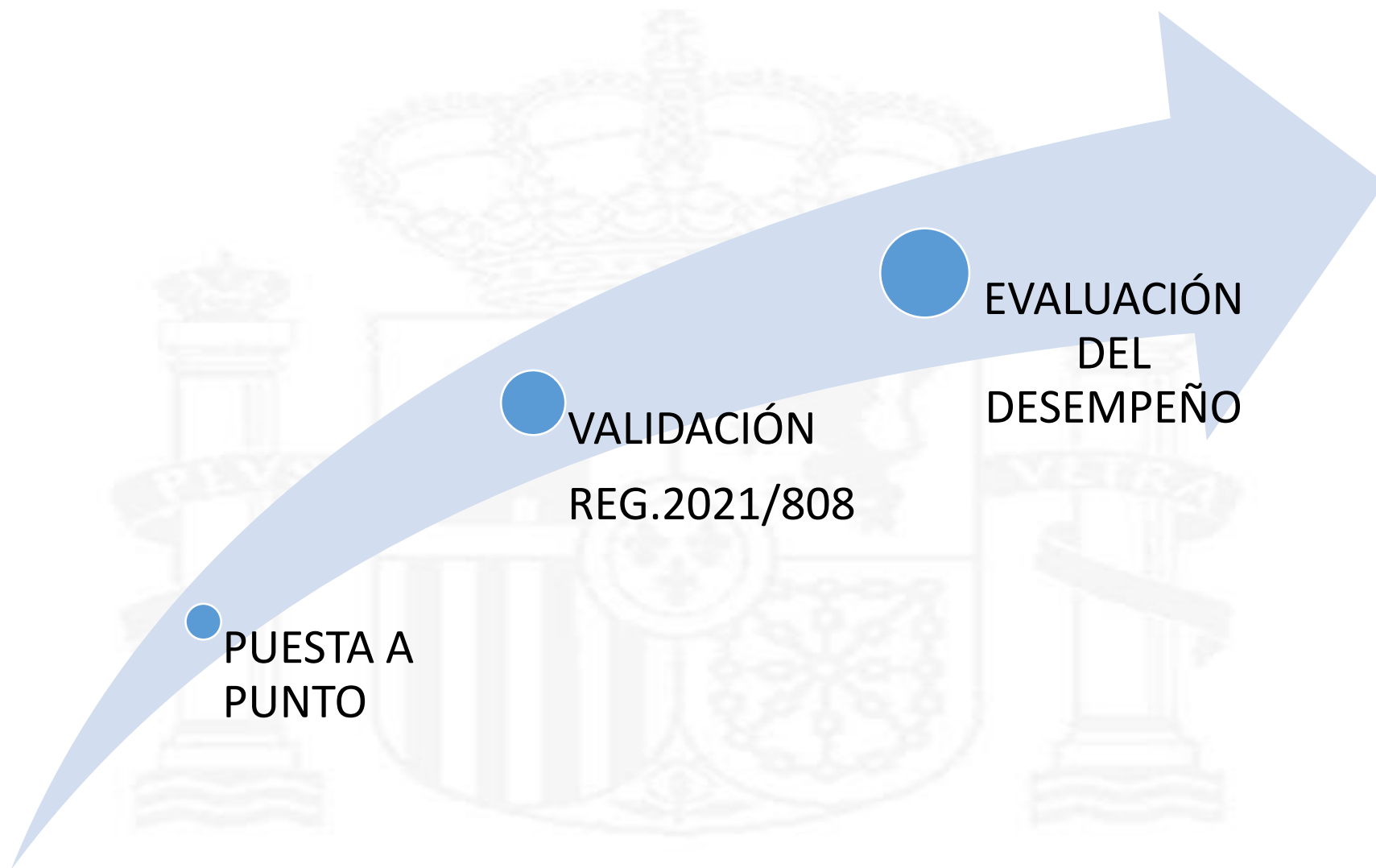
	AVES	BOVINO	PORCINO	CAPRINO OVINO	SALMÓN	RESTO PECES	RESTO
Ac. Nalidíxico	--	--	--	--	--	--	--
Ac. Oxolinico	100	100	100	100	100	100	100
Ciprofloxacina	100	100	100	100	100	100	100
Danofloxacina	200	200	100	200	100	100	100
Difloxacina	300	400	400	400	300	300	300
Enrofloxacina	100	100	100	100	100	100	100
Flumequina	400	200	200	200	600	600	200
Marbofloxacina	--	150	150	--	-	-	--
Norfloxacina	--	--	--	--	--	--	--
Sarafloxacina	--	--	--	--	30	--	--

**HASTA 3 LMR DIFERENTES
PARA EL MISMO ANALITO**

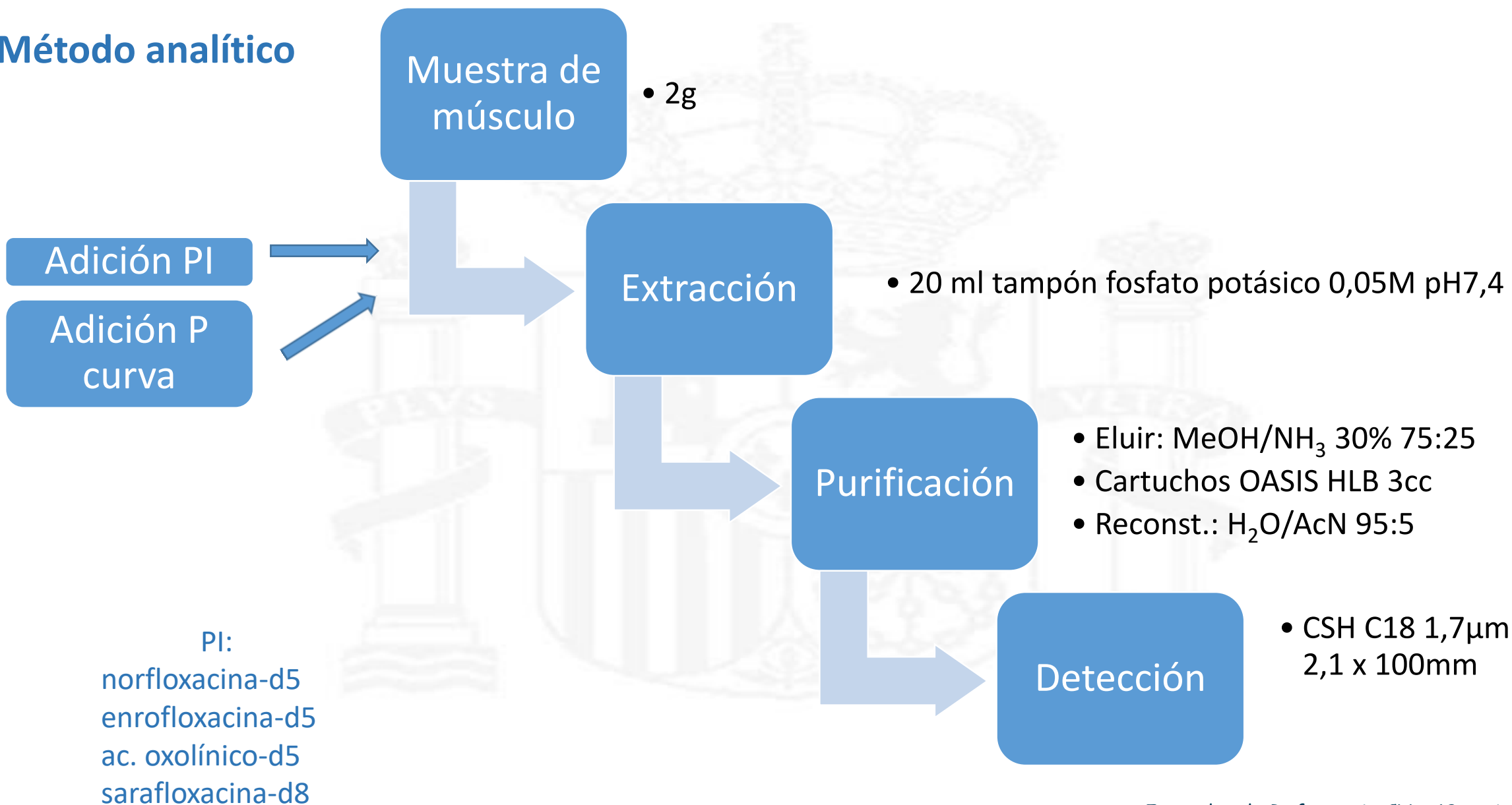
Reg. 37/2010: LMR MÚSCULO ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

	AVES	BOVINO	PORCINO	CAPRINO OVINO	SALMÓN	RESTO PECES	RESTO
Ac. Nalidíxico	--	--	--	--	--	--	--
Ac. Oxolinico	100	100	100	100	100	100	100
Ciprofloxacina	100	100	100	100	100	100	100
Danofloxacina	200	200	100	200	100	100	100
Difloxacina	300	400	400	400	300	300	300
Enrofloxacin	100	100	100	100	100	100	100
Flumequina	400	200	200	200	600	600	200
Marbofloxacina	--	150	150	--	-	-	--
Norfloxacina	--	--	--	--	--	--	--
Sarafloxacina	--	--	--	--	30	--	--

Rumiantes



Método analítico



Criterios previos del método (cromatografía y detección):

- Criterio LC: Tiempo de retención mínimo $> 2 * \text{Vol muerto de la columna}$

MARBO: 3,1 min $> 2 * 0,875$ min

- Criterio MS: Se necesitan 5 Puntos de identificación para cada analito

2 transiciones MRM de baja resolución (LR): 1 (1 ión precursor)+ 1,5*2 (iones producto)

1LC = 5 puntos de identificación.

Validación

L 180/84

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

21.5.2021

REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2021/808 DE LA COMISIÓN

de 22 de marzo de 2021

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

Version 1.1, 25 November 2021
EURL Guidance Document on
Confirmation Method Validation

European Union
Reference Laboratories
supported by the



EURL Guidance Document on Confirmation Method Validation

Cuadro 5

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

Método	Confirmación		Cribado		
	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo	Semicuantitativo	Cuantitativo
Sustancias	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identificación con arreglo a 1.2	x	x			
CC α	x	x			
CC β	-		x	x	x
Veracidad		x			x
Precisión		x		(x)	x
Efecto matriz relativo/ recuperación absoluta *		x			x
Selectividad/especificidad		x	x	x	x
Estabilidad #		x	x	x	x
Robustez		x	x	x	x

A: sustancias prohibidas o no autorizadas
B: sustancias autorizadas

Validación: Niveles de concentración a estudiar ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

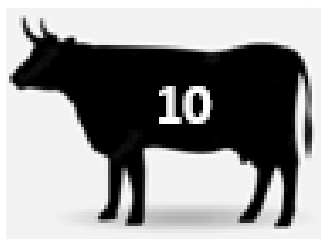
Analito	N0	N1	N2	N3	N4
	0	0,1LMR	0,5LMR	LMR	1,5LMR
OXO	0	10	50	100	150
CIPRO	0	10	50	100	150
DANO	0	20	100	200	300
DIFLO	0	40	200	400	600
ENRO	0	10	50	100	150
FLUME	0	20	100	200	300
MARBO	0	15	75	150*	225
Analito	N0	N1	N2	N3	N4
NOR	0	5	25	50	75
SARA	0	5	25	50	75
NAL	0	5	25	50	75

* No autorizada en OV_C

Precisión y veracidad

Validación

Diseño experimental



MÚSCULO DE RUMIANTE			NIVELES				
			0	1	2	3	4
			0	0,1LMR	0,5LMR	1LMR	1,5LMR
DÍA 1	ESPECIFICIDAD	A-U (n=21)	X	X			
DÍA 2	EFEECTO MATRIZ RELATIVO	A-U					
DÍA 3 SERIE 1	ADICIONES	A		S1M1N1		S1M1N3	S1M1N4
		B		S1M2N1		S1M2N3	S1M2N4
		C		S1M3N1		S1M3N3	S1M3N4
		D		S1M4N1		S1M4N3	S1M4N4
		E		S1M5N1		S1M5N3	S1M5N4
DÍA 4 SERIE 2	ADICIONES	A	S1C0	S1C1	S1C2	S1C3	S1C4
		K		S2M1N1		S2M1N3	S2M1N4
		L		S2M2N1		S2M2N3	S2M2N4
		M		S2M3N1		S2M3N3	S2M3N4
		N		S2M4N1		S2M4N3	S2M4N4
DÍA 5 SERIE 3	ADICIONES	O		S2M5N1		S2M5N3	S2M5N4
		K	S2C0	S2C1	S2C2	S2C3	S2C4
		F		S3M1N1		S3M1N3	S3M1N4
		G		S3M2N1		S3M2N3	S3M2N4
		H		S3M3N1		S3M3N3	S3M3N4
DÍA 6 SERIE 4	ADICIONES	I		S3M4N1		S3M4N3	S3M4N4
		J		S3M5N1		S3M5N3	S3M5N4
		F	S3C0	S3C1	S3C2	S3C3	S3C4
		P		S4M1N1		S4M1N3	S4M1N4
		Q		S4M2N1		S4M2N3	S4M2N4
DÍA 7	ROBUSTEZ	R		S4M3N1		S4M3N3	S4M3N4
		S		S4M4N1		S4M4N3	S4M4N4
		T		S4M6N1		S4M6N3	S4M6N4
		P	S4C0	S4C1	S4C2	S4C3	S4C4
		A				X	
A				X			
A 1				X			
A 1				X			
A 2				X			
A 2				X			
A 3				X			
A 3				X			

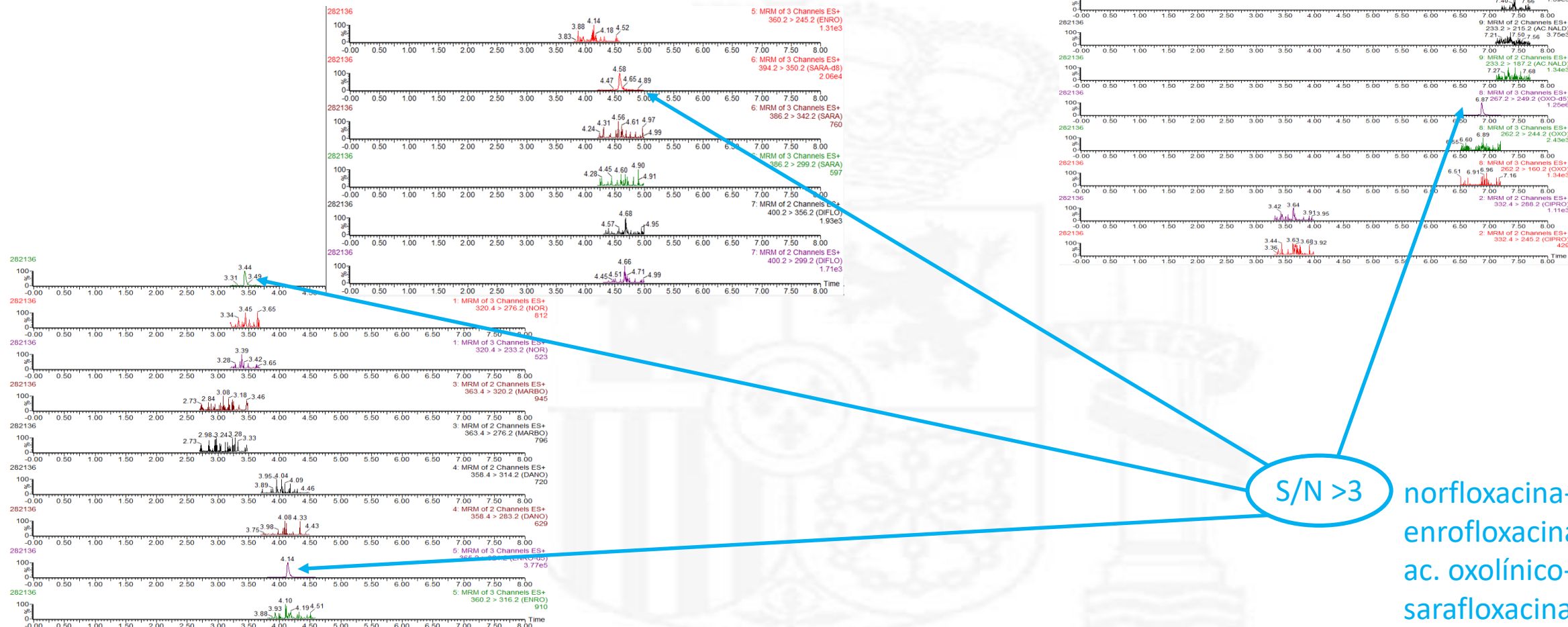
EFEECTO MATRIZ
1 SERIE
n=21

CCα, VERACIDAD, INCERTIDUMBRE,
REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD
4 SERIES/5 REPETIC/3N
n=20
CALIBRACIÓN (4 CURVAS/5 PUNTOS)

ROBUSTEZ
3 CAMBIOS MENORES

ESPECIFICIDAD
1 SERIE
n=21

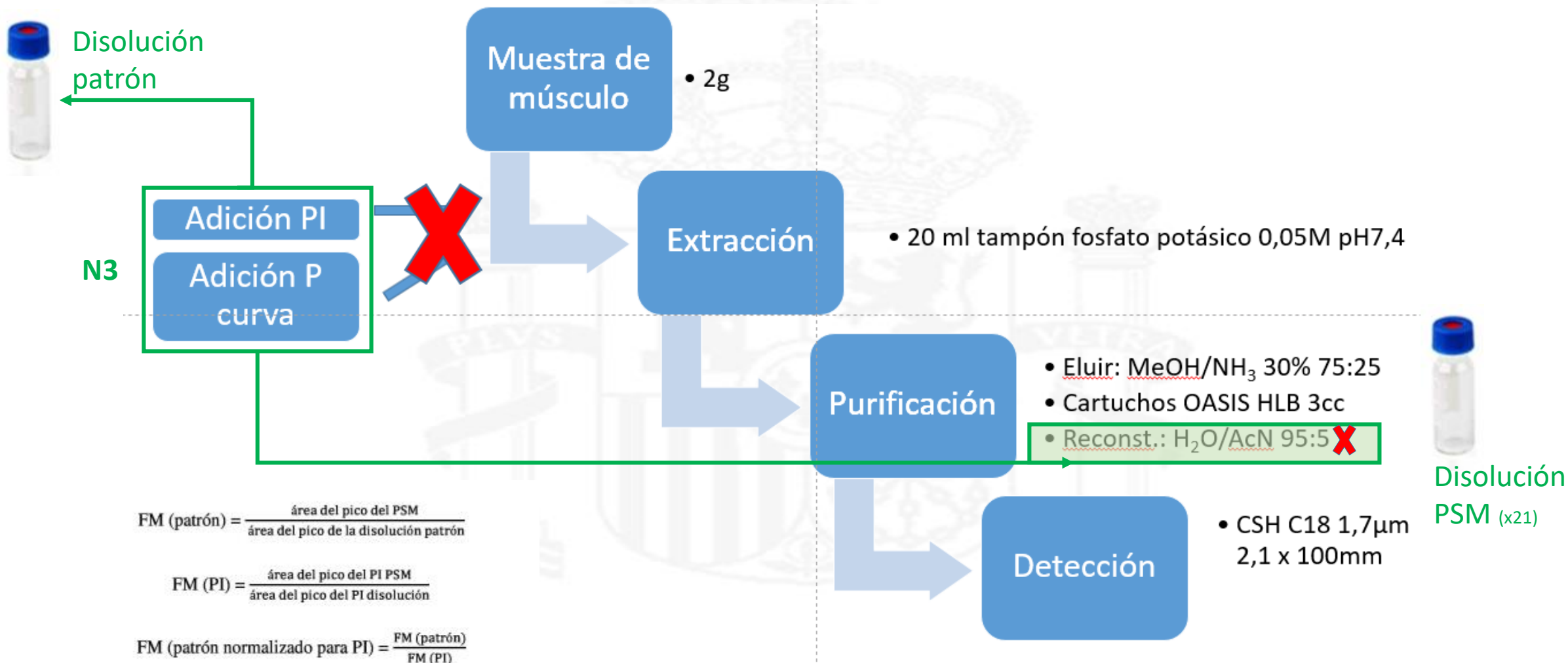
VALIDACIÓN: Especificidad



Sin interferencias en las 21 muestras blanco

S/N <3 (en los 2 MRM de los analitos)

VALIDACIÓN: Efecto matriz relativo



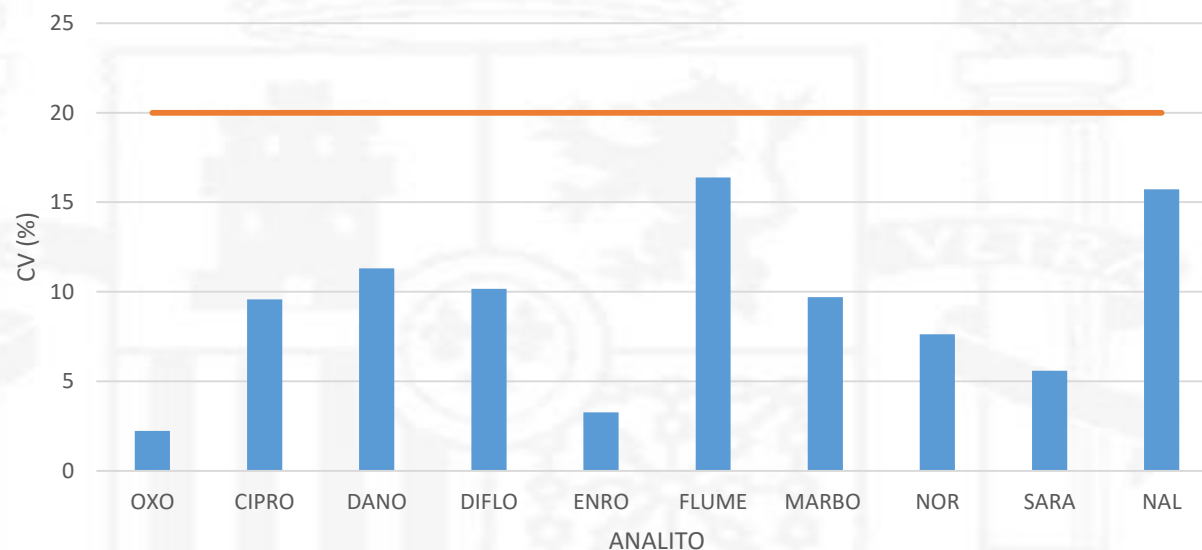
PI: patrón interno

PSM: patrón similar a la matriz

VALIDACIÓN: Efecto matriz relativo



EFFECTO MATRIZ RELATIVO



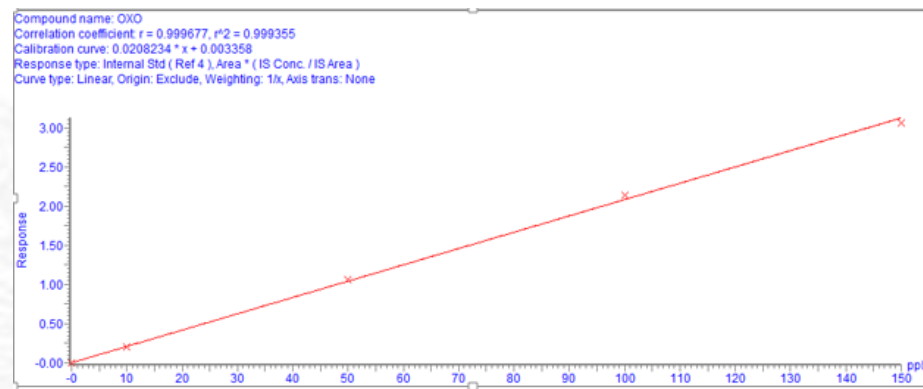
Efecto matriz corregido por el patrón interno Reg. 2021/808

Criterio : $CV < 20\%$



VALIDACIÓN: calibración

Residuales



NOR	CIPRO	DANO	ENRO	SARA	DIFLO	OXO	AC.NALD	FLUME	MARBO
9,53	8,24	9,16	6,50	11,84	8,89	5,36	9,95	7,37	13,89

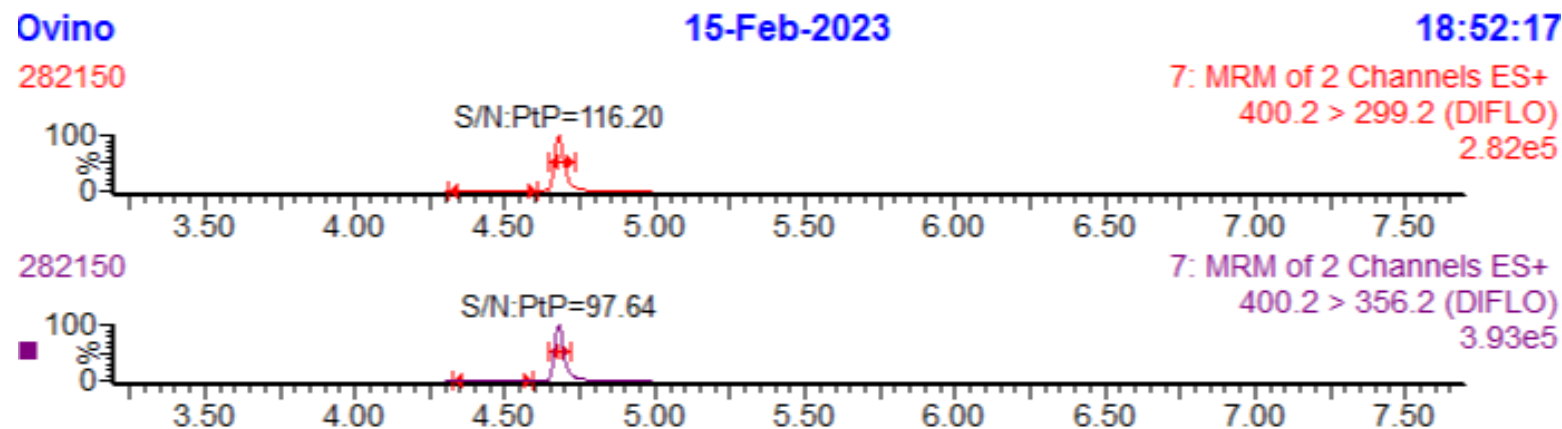
R²

NOR	CIPRO	DANO	ENRO	SARA	DIFLO	OXO	AC.NALD	FLUME	MARBO
0,9937	0,9962	0,9943	0,9986	0,9941	0,9962	0,9982	0,9936	0,9979	0,9966

Emplear al menos 5 niveles

Describir márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva (Desviación $\leq 15\%$; $R^2 \geq 0,95$)

VALIDACIÓN: confirmación



Intensidades relativas: la relación de iones del analito a confirmar corresponderá a la media de la relación de los puntos de calibración en matriz $\pm 40\%$.

La S/R de las dos transiciones características del compuesto serán ≥ 3 .

El TRR se debe encontrar en $\pm 1\%$ el valor medio obtenido en la curva de calibrado en matriz

VALIDACIÓN

Precisión:

Cuadro 2

Coefficiente de variación aceptable

Fracción de masa	CV de reproducibilidad (%)
> 1 000 µg/kg	16 (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
> 120 µg/kg – 1 000 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 el caso de los 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.

Veracidad:

Cuadro 1

Veracidad mínima de los métodos cuantitativos

Fracción de masa	Rango
≤ 1 µg/kg	– 50 % a +20 %
> 1 µg/kg a 10 µg/kg	– 30 % a +20 %
≥ 10 µg/kg	– 20 % a +20 %

VALIDACIÓN: repetibilidad (r) /reproducibilidad (R)

r/R	N1	N3	N4
NOR	11,88/16,25	8,74/8,86	5,24/5,50
CIPRO	13,68/14,53	9,40/10,42	11,35/12,11
DANO	13,62/14,83	8,21/9,73	10,18/12,05
ENRO	6,20/6,20	4,18/4,91	3,94/4,52
SARA	12,55/13,25	7,49/8,46	7,39/9,87
DIFLO	11,89/12,97	7,06/9,96	8,89/11,51
OXO	5,31/5,31	3,53/4,57	3,24/3,24
AC.NALD	12,62/12,62	11,22/11,22	10,99/12,92
FLUME	14,57/14,57	11,42/11,52	10,99/10,99
MARBO	19,80/19,80	12,96/13,38	12,85/12,99

El concepto de repetibilidad ha cambiado:

se utilizan diferentes muestras

r y R son similares

VALIDACIÓN

Precisión:

Cuadro 2

Coefficiente de variación aceptable

Fracción de masa	CV de reproducibilidad (%)
> 1 000 µg/kg	16 (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
> 120 µg/kg – 1 000 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.

y corresponda al nivel 0.1 del valor central (LMR...) →30%

VALOR ↑ → U ↑

En el caso de los 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.

Veracidad:

Cuadro 1

Veracidad mínima de los métodos cuantitativos

Fracción de masa	Rango
≤ 1 µg/kg	- 50 % a +20 %
> 1 µg/kg a 10 µg/kg	- 30 % a +20 %
≥ 10 µg/kg	- 20 % a +20 %

Cumple los criterios del Reg. 2021/808

VALIDACIÓN: Incertidumbre expandida

U (%)	N1	N3	N4
OXO	10,88	9,36	6,65
CIPRO	29,78	21,36	24,82
DANO	30,39	19,93	24,69
DIFLO	26,59	20,41	23,60
ENRO	12,70	10,06	9,26
FLUME	29,85	23,62	22,52
MARBO	40,57	27,42	26,63
NOR	33,29	18,17	11,28
SARA	27,14	17,35	20,22
NAL	25,87	23,00	26,48

$$U = k \cdot \sqrt{(u_R)^2 + (u_{Rec})^2}$$

U= incertidumbre expandida

K=2 para nivel de confianza del 95%

U_R = Incertidumbre de la reproducibilidad interna del procedimiento analítico (CV_R)

U_{rec} = Incertidumbre de recuperación/veracidad $U_{rec} = CV_R / \sqrt{n}$
n= número de valores utilizados para calcular CV_R .

VALIDACIÓN: Límite de decisión para confirmación

2. En el caso de sustancias autorizadas, el CCα se calculará como sigue:

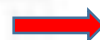
a) para las sustancias autorizadas en combinaciones de matrices/especies para las que se haya fijado un LMR o un CM:

i) Método 1: mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843-1:1997 (donde se denomina «valor crítico de la variable de estado neto»). En este caso, se utilizará material en blanco enriquecido hasta el LMR o el CM, y por encima de ellos, en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal cuando sea posible, o la concentración recalculada, frente a la concentración añadida. El límite de decisión ($\alpha = 5\%$) es igual a la concentración correspondiente al LMR o el CM más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio en el límite permitido.

ii) Método 2: $CC\alpha = LMR$ (o CM) + $k(\text{unilateral, } 95\%) \times \text{incertidumbre estándar (combinada) de medida al LMR o CM}$.

En el caso de sustancias autorizadas, dependiendo del experimento de validación (y de sus respectivos grados de libertad), podría aplicarse razonablemente la distribución t , o si se toma como base la distribución de Gauss (unilateral, $n = \infty$) se utilizará un factor k de 1,64.

$$CC\alpha = MRL + 1.64 * u_c$$



$$CC\alpha = NMC + 2,33 * u_c$$



OXO	CIPRO	ENRO	MARBO	DANO	FLUME	DIFLO	NOR	SARA	NAL
108	118	108	184 (B) 22,3(O-C)	233	237	468	7,00	6,60	6,51

El CCα de las sustancias autorizadas será superior, pero lo más cercano posible, al LMR o al CM.

El CCα de las sustancias no autorizadas será el más bajo posible de alcanzar razonablemente.

2.6. Límite de decisión para confirmación (CCα)

El CCα se determinará para los métodos de confirmación. El CCα se establecerá en condiciones que cumplan los requisitos de identificación o identificación más cuantificación definidos en los «Criterios de funcionamiento y otros requisitos de los métodos analíticos» establecidos en el capítulo 1.

Para el control de conformidad de las muestras, la incertidumbre estándar combinada de medida ya ha sido tenida en cuenta en el valor del CCα (límite de decisión para confirmación).

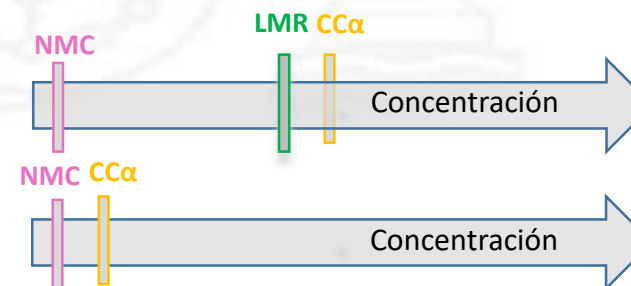
1. En el caso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas, el CCα se calculará como sigue:

a) Método 1: mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843-1:1997 (*) (donde se denomina «valor crítico de la variable de estado neto»). En este caso, se utilizará material en blanco enriquecido hasta el VRI o el NMC, y por encima de ellos, en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal cuando sea posible, o la concentración recalculada, frente a la concentración añadida. El límite de decisión es igual a la concentración correspondiente en la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio en la ordenada en el origen. Este método solo es aplicable a ensayos cuantitativos. Los límites de decisión obtenidos con este método se verificarán analizando matrices en blanco enriquecidas al límite de decisión calculado.

b) Método 2: analizando un mínimo de 20 materiales en blanco representativos por matriz, para poder calcular la relación señal-ruido en la banda de tiempo en la que se espera encontrar el analito. Puede usarse como límite de decisión un valor triple al de la relación señal-ruido. Esto es aplicable a análisis cuantitativos y cualitativos. Los límites de decisión obtenidos con este método se verificarán analizando matrices en blanco enriquecidas al límite de decisión calculado.

c) Método 3: $CC\alpha = NMC + k(\text{unilateral, } 99\%) \times \text{incertidumbre estándar (combinada) de medida al NMC}$

En el caso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas, dependiendo del experimento de validación (y de sus respectivos grados de libertad), podría aplicarse razonablemente la distribución t , o si se toma como base la distribución de Gauss (unilateral, $n = \infty$) se utilizará un factor k de 2,33.

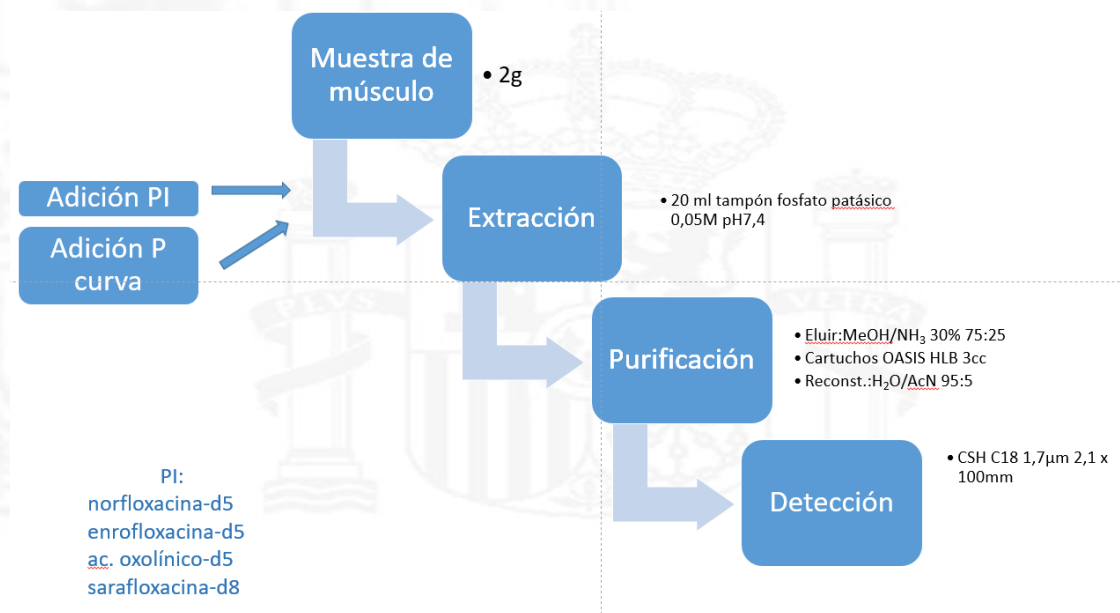


VALIDACIÓN: Robustez

Cambios menores incluidos en las series de validación: diferentes soluciones patrón, 2 columnas UPLC, 2 analistas....

Cambios menores incluidos en el estudio de robustez adicional:

- A.- Sonicar a 30 °C en lugar de a Tª ambiente
- B.- Centrifugar 10 min en lugar de 15 min
- C.- Evaporar a 50 °C en lugar de a 40-45 °C



VALIDACIÓN: Robustez

- Youden-approach:

Experiment							
1	2	3	4	5	6	7	8
A	A	A	A	a	a	a	A
B	B	b	b	B	B	b	b
C	c	C	c	C	c	C	c
D	D	d	d	d	d	D	D
E	e	E	e	e	E	e	E

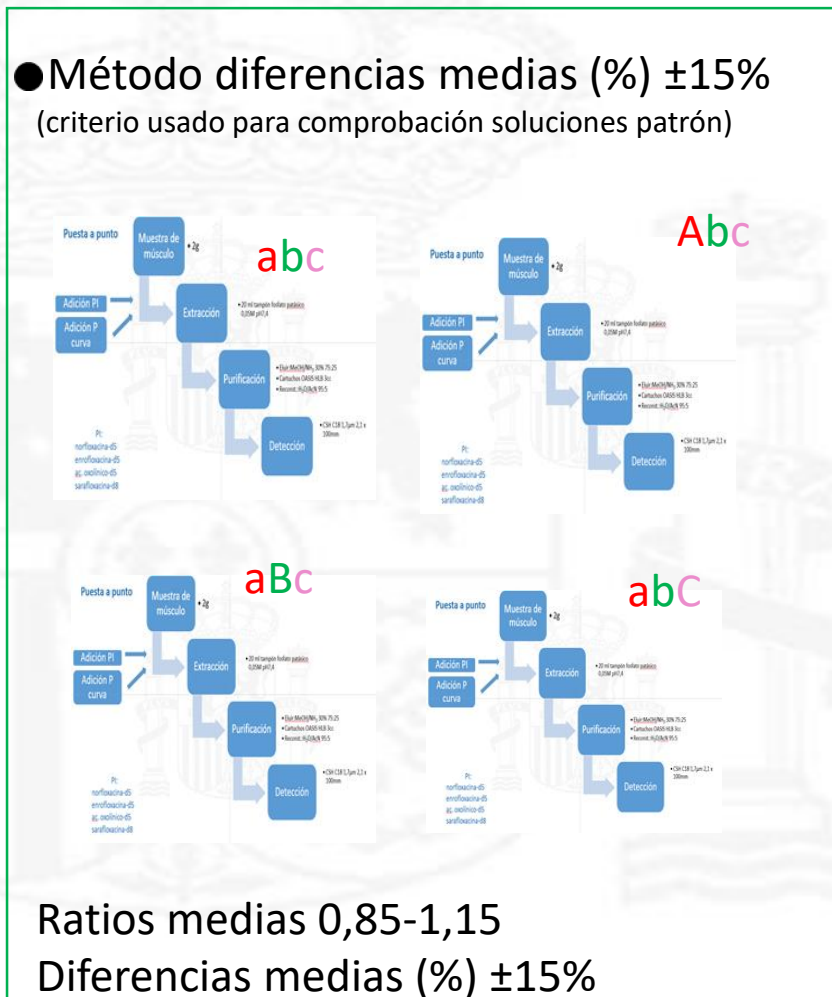
$$SDi = \sqrt{2x \sum \frac{Df^2}{7}}$$

Si Sdi > SD método en condiciones de reproducibilidad intralab → no robusto (la combinación de factores modificados tiene efectos en el resultado)

Se demuestra que el método es robusto

- Método diferencias medias (%) ±15% (criterio usado para comprobación soluciones patrón)

- Otros

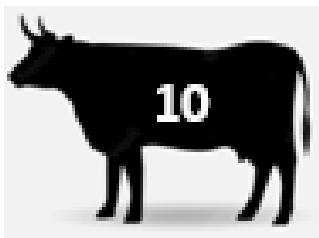


Ratios medias 0,85-1,15
Diferencias medias (%) ±15%



VALIDACIÓN en números

Experimentos realizados



Nº SERIE FECHA HT	MATRIZ Y ESPECIE		NIVELES				
			0	1	2	3	4
DÍA 1 13/02/23 Nº106	ESPECIFICIDAD (n=11)	A-F (Bov)	X	X		X	
DÍA 2 15/02/23 Nº107		G-H y I-J (Bov)	X	X			X
DÍA 3 22/02/23 Nº108	EFFECTO MATRIZ RELATIVO	K-O (Ov)	X	X			X
DÍA 4 27/02/23 SERIE 1 Nº109		P y U (Cap)	X	X			X
	ADICIONES	A	190656	S1M1N1			
	B	190652	S1M2N1				
	C	190658	S1M3N1				
	D	190651					
E	190653						
DÍA 5 01/03/23 SERIE 2 Nº110	ADICIONES	A	190656	S1M1N1			
DÍA 8 13/03/23 SERIE 5 Nº113	CURVA	K	190656	S2C4			
	ADICIONES	A	190656	S3M1N1			
	M	190714	S3M2N1				
	L	190713	S3M3N1				
	CURVA	U	230061	S3C4			
DÍA 9 29/03/23 Nº117	ADICIONES	A	190656	S4M1N1			
	A 1	190656	S4M2N1				
	A 1	190656	S4M3N1				
	A 2	190656	S4M4N1				
	A 2	190656	S4M1N3				
	A 3	190656	S4M2N3				
	A 3	190656	S4M3N3				
	A 3	190656	S4M4N3				
ADICIONES	A	190656	S5M1N1				
A	190656	S5M2N1					
A 1	190656	S5M3N1					
A 1	190656	S5C1					
A 2	190656	S5C2					
A 2	190656	S5C3					
A 3	190656	S5C4					
A 3	190656	S5C1					
A 3	190656	S5C2					
A 3	190656	S5C3					
A 3	190656	S5C4					

ESPECIFICIDAD

2 SERIES

EFFECTO MATRIZ

EFFECTO ESPECIE

TOTALES

Rectas de calibrado

1

3

4

20

20

20

Extracciones

Muestras blanco

21

5

Serie

260

9

CC α , VERACIDAD, INCERTIDUMBRE, REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

5 SERIES

n=20

CALIBRACIÓN (5 CURVAS/5 PUNTOS)

ROBUSTEZ

3 CAMBIOS MENORES



VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE
ANÁLISIS DE QUINOLONAS EN
MÚSCULO POR LC-MS/MS
SEGÚN REC 2021/808



zoosanitarios-cna@aesan.gob.es
rjimenezm@aesan.gob.es