

Abril 2011
Revisión: Mayo 2013

GUÍA PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS EN MATRICES BIOLÓGICAS DE ORIGEN ANIMAL



Guía nº 2 – G.F.

AUTORES

Participaron en la confección de la guía miembros de las siguientes instituciones que forman parte del grupo ad hoc de Fármacos Veterinarios de la Fundación PROSAIA:

Aparición según orden alfabético:

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria

Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (CAPROVE):

Cámara de Laboratorios Argentinos Medicinales Veterinarios (CLAMEVET):

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA)

- Dirección de Productos Veterinarios y Alimentos para Animales. Dirección Nacional de Agroquímicos, Productos Veterinarios y Alimentos – SENASA.
- Coordinación de Residuos Químicos de la Dirección de Laboratorio Animal - Dirección General de Laboratorio y Control Técnico – SENASA.

Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA):

- Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Bs. As. – Tandil.

Universidad Nacional del Litoral (UNL):

- Cátedra de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.
- Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

- Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias y Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

Coordinación del grupo a cargo del Dr. Javier Pardo (Fundación PROSAIA)

Tabla de contenidos

| | |
|---|----|
| 1. Introducción..... | 3 |
| 1.1 Objetivo de la guía..... | 3 |
| 1.2 Antecedentes..... | 3 |
| 2. Alcance | 3 |
| 3. Parámetros a tener en cuenta para la validación del método analítico | 4 |
| 3.1. Linealidad..... | 4 |
| 3.2. Exactitud..... | 5 |
| 3.3. Presición | 5 |
| 3.4. Límite de detección | 6 |
| 3.5. Límite de cuantificación | 6 |
| 3.6. Selectividad | 6 |
| 3.7. Estabilidad en la matriz | 6 |
| 3.8. Estabilidad en la muestra procesada | 7 |
| 3.9. Robustez | 7 |
| 4. Glosario | 8 |
| Anexo 1 | 10 |
| Anexo 2 | 11 |
| Anexo 3 | 12 |
| Anexo 4 | 20 |

Prólogo

PROSAIA: La Seguridad Alimentaria y la producción de productos farmacéuticos veterinarios.

“Animales sanos, alimentos sanos, gente sana”.

La Argentina como productora de alimentos de calidad afronta entre otros desafíos el acecho de enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes que, debido a los cambios culturales ocurridos en el mundo en los últimos años, se hallan en continua expansión (BSE, Influenza Aviar, Nipah, West Nile Fever, Rift Valley Fever entre otras). Muchas de estas son zoonosis, lo que ha ocasionado cambios muy profundos en los sistemas de garantías exigidos por las autoridades sanitarias, entre las cuales la seguridad sanitaria de los alimentos es un requisito indispensable. Para alcanzar la seguridad alimentaria de los alimentos es necesario, entre otras condiciones, disponer de productos farmacéuticos veterinarios y biológicos de seguridad y pureza probadas que garanticen, junto con su correcta aplicación, que los productos y subproductos obtenidos de los animales se conviertan en alimentos que no sean causantes de enfermedades por la presencia de contaminantes o agentes patógenos, en forma involuntaria -inocuidad- o deliberada -bioterrorismo- y contribuir así a preservar la salud y protección de los consumidores.

Para eso existen principios fundamentales que se deben tener en cuenta en la formulación de los insumos para los animales de abasto incluidos los alimentos y los productos farmacológicos. Estos principios incluyen el control de la fuente, la manipulación de los materiales utilizados y el diseño de un sistema de elaboración adecuado que contemple:

La normativa, recomendaciones y estándares nacionales e internacionales.

Este es un aspecto primordial que deben cumplir todos los productos farmacéuticos veterinarios ya que, de no ser así, se corre el riesgo de que los productos y subproductos obtenidos de los animales tratados queden fuera de los mercados.

Las Buenas Prácticas de Manufactura.

“Buenas Prácticas de Manufactura es aquella parte del aseguramiento de la calidad que garantiza que los productos sean consistentemente producidos y controlados de acuerdo a los estándares de calidad apropiados al uso al que están destinados y según lo requiera su autorización de comercialización.” WHO Good Manufacturing Practices for Pharmaceutical Products.

Por lo tanto, mantenerse y desarrollar un negocio competitivo como proveedores de alimentos dentro de este contexto presupone además cumplir con los requisitos implícitos y explícitos que los consumidores demandan. Entre esos requisitos los atributos de inocuidad involucran la aplicación de sistemas de aseguramiento de la calidad tales como Buenas Prácticas Agrícolas, Buenas Prácticas de Manufactura, HACCP, determinación de niveles o ausencia de residuos, de pesticidas, de antibióticos y garantía de que los productos farmacológicos utilizados en el control de las enfermedades de los animales cumplen con las normas internacionales.

Dentro de este marco de referencia y en cumplimiento de los objetivos de su creación, PROSAIA convocó a los principales referentes en la materia del organismo regulador SENASA, la Academia y las cámaras representativas a conformar un Grupo Ad-Hoc para la Redacción y Actualización de Guías, Protocolos y Normativas para el Correcto Desarrollo de Productos Veterinarios, como un aporte para la adecuación a los tiempos que vivimos.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'CVG', on a light pink background.

Dr. Carlos Van Gelderen

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A. Schudel', on a light pink background.

Dr. Alejandro Schudel

1. Introducción

1.1. Objetivo de la guía

Este documento guía tiene como fin proporcionar una descripción general de los criterios que se consideran aceptables para la validación de los métodos analíticos utilizados en estudios de eliminación de residuos de medicamentos veterinarios en tejidos animales u otras matrices biológicas.

Durante el proceso de desarrollo o adecuación de medicamentos veterinarios, se pueden llevar a cabo estudios farmacocinéticos, de eliminación de residuos, o bioequivalencia con el fin de determinar y analizar concentraciones del analito en diferentes matrices biológicas (tejidos, plasma, leche, huevos o miel) de animales tratados. Esa información se utiliza en presentaciones ante la autoridad regulatoria en los distintos países del mundo.

La validación de la metodología utilizada durante los estudios en matrices biológicas respalda la confiabilidad de los datos experimentales obtenidos. La presentación de métodos validados y sus requisitos están bien definidos por diversos organismos internacionales reconocidos e incluso pueden estar definidos por la ley.

Esta guía tiene como fin el abordaje de la validación de los métodos analíticos para la determinación de los principios activos suministrados o sus metabolitos en las distintas matrices biológicas, considerando las recomendaciones de las asociaciones de química analítica y autoridades sanitarias.

1.2. Antecedentes

Como fundamento para esta guía se utilizó la guía del VICH n° 49 “Guidelines for the Validation of Analytical Methods used in Residue Depletion Studies – Noviembre 2009”.

El presente trabajo intenta, basándose en los antecedentes mencionados, proponer protocolos adaptados a los requerimientos y necesidades que pueden ser útiles para los países de la región.

2. Alcance

Procedimientos analíticos que se han desarrollado para evaluar:

- estudios de eliminación de residuos con el fin de fijar los períodos de retiro o carencia.
- estudios farmacocinéticos y de distribución tisular.
- estudios de bioequivalencia *in vivo*.

Esta guía no tiene como objetivo definir los criterios para la validación de los procedimientos en el monitoreo de los residuos por parte de los organismos de control oficial.

El propósito es que los métodos validados de conformidad con esta guía proporcionen datos sobre residuos que sean aceptables para los organismos regulatorios a la hora de determinar los períodos adecuados de espera.

3. Parámetros a tener en cuenta para la validación del método analítico

La validación de un método de ensayo tiene parámetros específicos a tener en cuenta, se debe realizar en la o las matrices seleccionadas y deberá incluir, dentro del rango analítico, el Límite Máximo de Residuos (LMR) para la sustancia en estudio. Los parámetros a considerar en un proceso de validación son los siguientes:

Linealidad

Exactitud

Precisión

Límite de detección

Límite de cuantificación

Selectividad

Estabilidad en la matriz

Estabilidad en la muestra procesada

Robustez

A continuación se describirá cada uno de los parámetros de validación.

3.1. Linealidad

Se debe generar una curva de calibración en la que se demuestre la relación lineal dentro del rango de trabajo. Las concentraciones a usar se deben corresponder con las esperadas en las matrices) en las que se va a realizar el ensayo (por ejemplo: plasma, tejidos, leche, huevos, miel). Es decir, deberán encontrarse alrededor del LMR, utilizándose este como punto medio de la curva. Las curvas de calibración se pueden construir de tres maneras distintas según la metodología:

- a) estándares en solución (solvente/buffer),
- b) matriz sometida al proceso de extracción y posteriormente fortificada con el estándar.
- c) matriz fortificada con el estándar y posteriormente procesadas mediante el procedimiento de extracción.

La linealidad debe describirse mediante un gráfico de regresión lineal de concentración conocida frente a la respuesta utilizando 5 concentraciones diferentes por triplicado, como mínimo. Se efectúa el tratamiento estadístico de los datos determinando los siguientes parámetros: ordenada al origen, pendiente (Sensibilidad), coeficiente de regresión y repetibilidad para cada nivel de concentración. La relación lineal generalmente se describe mejor mediante regresión lineal sin ponderar, pero puede establecerse mediante regresión lineal ponderada con factores de ponderación adecuados en el caso que haya varianza no homogénea de los datos experimentales (heterocedasticidad).

El criterio de aceptación recomendado para una curva estándar depende del formato de la misma. Las curvas de calibración creadas de acuerdo a lo descrito en el ítem c) están sujetas a los mismos criterios de aceptación que las muestras fortificadas (consultar la sección 3.3 Precisión). Las curvas de calibración creadas en base a los ítems a) o b) requieren criterios de

aceptación más rigurosos y en general se aceptan los siguientes criterios: repetibilidad $\leq 15\%$ y coeficiente de correlación $\geq 0,98$.

Es posible que en algunos ensayos se requieran transformaciones logarítmicas (p. ej., los ensayos microbiológicos) para lograr la linealidad, mientras que en otros ensayos (p. ej., ELISA, RIA) es posible que se requiera una función matemática más compleja para establecer la relación entre la concentración y la respuesta. **3.2. Exactitud**

Generalmente se expresa como % de recuperación o % de error. La exactitud está estrechamente relacionada con el error sistemático (sesgo del método analítico) y la recuperación del analito (medida como el porcentaje de recuperación). La exactitud recomendada para los métodos de residuos variará según la concentración del analito. Las medias de exactitud recomendadas en función de la concentración del analito provista por las pautas de CODEX¹ se enumeran a continuación:

| Concentración de analito* | Rango aceptable |
|---------------------------|-----------------|
| < 1 µg/kg | -50 % a +20 % |
| ≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg | -40 % a +20 % |
| ≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg | -30 % a +10 % |
| ≥ 100 µg/kg | -20 % a +10 % |

* µg/kg = ng/g = ppb

3.3. Precisión

La precisión en la validación de un laboratorio debiera incluir un componente de intra-ensayo (repetibilidad) y uno inter-ensayo (precisión intermedia).. En general no es necesario determinar la reproducibilidad (precisión inter-laboratorios) para poder realizar un estudio de eliminación de residuos, porque el laboratorio que suele desarrollar el método es el mismo laboratorio que lleva a cabo el ensayo con las muestras del estudio de residuos. La repetibilidad y la precisión intermedia deben determinarse mediante la evaluación de un mínimo de tres replicas en tres concentraciones diferentes que representen el rango de validación objetivo (que debe incluir el LOQ) en tres días de análisis.

A los fines de la validación del método de ensayo, la variabilidad aceptable depende de la concentración del analito. La precisión aceptable recomendada provista por la guía CODEX² se enumera en la siguiente tabla:

| Concentración de analito | Precisión inter-ensayo (precisión intermedia), CV% |
|--------------------------|--|
| < 1 µg/kg | 35% |
| ≥ 1 µg/kg < 10 µg/kg | 30% |

| | |
|---|-----|
| $\geq 10 \mu\text{g/kg} < 100 \mu\text{g/kg}$ | 20% |
| $\geq 100 \mu\text{g/kg}$ | 15% |

El Coeficiente de Variación (CV) de la repetibilidad determinada para cada punto de concentración no debe exceder el 15%, excepto para el LOQ³, donde éste no debe desviarse más del 20%. El CV se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{\text{DesvíoEstándar}}{\text{Media}} * 100$$

3.4. Límite de detección

Hay varias maneras científicamente válidas de determinar el LOD y cualquiera de ellas puede utilizarse siempre y cuando se proporcione una justificación científica de su uso. En el Anexo 1 y en el Anexo 2 se muestran ejemplos de métodos aceptados para determinar el LOD, y en el Anexo 3 se puede consultar un protocolo sugerido para determinar la exactitud, la precisión, el LOD, el LOQ y la selectividad en un único estudio.

3.5. Límite de cuantificación

Al igual que con el LOD, hay varias maneras científicamente válidas de determinar el LOQ y cualquiera de ellas puede utilizarse siempre y cuando se proporcione una justificación científica de su uso. En el Anexo 1 y en el Anexo 2 se muestran ejemplos de métodos aceptados para determinar el LOD, y en el Anexo 3 se puede consultar un protocolo sugerido para determinar la exactitud, la precisión, el LOD, el LOQ y la selectividad en un único estudio.

3.6. Selectividad

En el caso de los métodos utilizados en estudios de residuos, la selectividad se define principalmente con relación a las sustancias endógenas presentes en la matriz y metabolitos distintos del / de los residuo/s marcador/es. Debido a que los estudios de residuos están bien controlados, los componentes administrados en forma exógena (es decir, otros medicamentos o vacunas veterinarias) se conocen o no se permiten durante el estudio.

Una buena medición de la selectividad de un ensayo es la determinación de la respuesta de las muestras de control. Esa respuesta no debe superar el 20% de la respuesta en el LOQ. Consultar el Anexo 3 para conocer el protocolo sugerido para determinar la exactitud, la precisión, el LOD, el LOQ y la selectividad en un único estudio.

3.7. Estabilidad en la matriz

Las muestras recopiladas de estudios de residuos generalmente se congelan y se almacenan hasta realizar el ensayo. Es necesario determinar cuánto tiempo esas muestras se pueden almacenar en las condiciones de almacenamiento propuestas sin que sufran una degradación excesiva antes del análisis. Como parte del procedimiento de validación o como un estudio distinto, se debe llevar a cabo un estudio de estabilidad para establecer las condiciones de almacenamiento apropiadas (p. ej., 4° C, -20° C o -70° C) y el período de tiempo durante el cual se pueden almacenar las muestras antes del análisis.

Para realizar el ensayo, deben fortificarse muestra control (libres de analito) con cantidades conocidas de analito y almacenarse en las condiciones adecuadas. Las muestras se analizarán periódicamente en intervalos específicos (p. ej., al inicio, 1 semana, 1 mes y 3 meses). Si las muestras se congelan, se deben realizar estudios de congelamiento/descongelamiento (3 ciclos de congelamiento/descongelamiento, un ciclo por día como mínimo). En forma alternativa, se pueden utilizar muestras reales con ensayos realizados para establecer las concentraciones iniciales. El protocolo recomendado para evaluar la estabilidad en la matriz es el análisis de dos concentraciones diferentes por triplicado cerca de los extremos superior e inferior del rango de validación. La estabilidad en la matriz es considerada aceptable si la concentración media obtenida en el punto de tiempo específico de estabilidad se encuentra dentro de los criterios de aceptación de la exactitud, esto de acuerdo a los resultados de la valoración inicial o de la valoración de la muestra control recién fortificada.

3.8. Estabilidad en la muestra procesada

A menudo, las muestras se procesan un día y se analizan el segundo día o debido a una falla de instrumentos se almacenan durante días adicionales, p. ej., el fin de semana. La estabilidad del analito en el extracto de la muestra procesada puede examinarse según sea necesario para determinar la estabilidad en condiciones de almacenamiento de muestras procesadas. Algunos ejemplos de condiciones de almacenamiento serían, entre 4 y 24 horas a temperatura ambiente y 48 horas a 4° C. Se pueden investigar otras condiciones de almacenamiento de acuerdo con los requisitos del método.

El protocolo recomendado para evaluar la estabilidad en la muestra procesada es el análisis de dos concentraciones diferentes por triplicado cerca de los extremos superior e inferior del rango de validación. La estabilidad de muestras procesadas es considerada adecuada si la concentración media obtenida al punto de tiempo específico de estabilidad se encuentra dentro de los criterios de aceptación de exactitud, esto de acuerdo a los resultados de la valoración inicial o de la valoración de la muestra control recién fortificada y procesada.

3.9. Robustez

La evaluación de la robustez de los métodos analíticos es de gran importancia. Debe evaluarse en particular en las áreas del método que podrían sufrir cambios o modificaciones con el paso del tiempo. Esas áreas podrían incluir variación de lotes de reactivos o con diferentes tiempos de preparación, temperaturas de incubación, composición y volumen del solvente de extracción, momento de extracción y cantidad de extracciones, extracción en fase sólida, la marca y los lotes de los cartuchos, la marca y los lotes de la columna analítica y la composición del solvente eluyente para HPLC, el pH. Durante el desarrollo, la validación o el uso del ensayo, la sensibilidad del método a alguna de esas condiciones, o a todas, pueden volverse evidentes y se deben evaluar las variaciones en aquellos que tienen más probabilidades de afectar el rendimiento del método.

En el Anexo 4 se presenta un ejemplo sugerido para realizar este ensayo.

4. Glosario

Analito: Especie o entidad química involucrada. Elemento que se desea buscar o determinar en una muestra.

Bioequivalencia: Dos especialidades medicinales son bioequivalentes cuando siendo equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas sus biodisponibilidades después de la administración en la misma dosis molar son semejantes en tal grado, que puede esperarse que sus efectos sean esencialmente los mismos (OMS 1996).

Exactitud: Grado de coincidencia del valor medido con el valor verdadero o el valor esperado. (CAMEVET)

Farmacocinética:

Es la rama de la Farmacología que estudia el paso de las sustancias activas a través del organismo en función del tiempo y de la dosis. Comprende los procesos de absorción, distribución, metabolismo o biotransformación y excreción de las sustancias activas. (Se ha actualizado la definición CAMEVET, para excluir el término “droga”).

Límite de cuantificación (LOQ): Es la menor concentración de analito que puede ser cuantificada con un aceptable nivel de exactitud y precisión.

Límite de detección (LOD): Es la menor concentración de analito a partir de la cual es posible demostrar la presencia del mismo en la muestra experimental con un grado aceptable de certeza.

Linealidad: Capacidad de un método analítico de producir resultados que sean directamente, o por medio de una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

Matriz: Material predominante, componente o sustrato que contiene el analito de interés. Para efectos de los estudios de eliminación de residuos es el producto animal comestible (tejido, huevo, leche o miel) que contiene o podría contener el residuo de interés.

Muestra control: se refiere a tejido, plasma, leche, huevos, miel u otro material biológico proveniente de un animal que no fue tratado con el fármaco veterinario en investigación.

Muestra procesada: es una muestra que ha sido procesada utilizando un procedimiento analítico determinado de modo de extraer el analito de interés.

Muestra real: tejido, plasma, leche, huevos, miel u otro material biológico proveniente de un animal tratado con el medicamento veterinario en investigación.

Precisión: Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por la aplicación de un procedimiento analítico repetidas veces a una muestra homogénea, bajo las condiciones prescritas abarcando la repetibilidad y la reproducibilidad. (CAMEVET)

Repetibilidad o precisión intra-ensayo: Es el grado de precisión obtenido con el uso de un procedimiento analítico dentro de un laboratorio en un período corto de tiempo, usando el mismo analista con el mismo equipamiento (USP 23). (CAMEVET)

Reproducibilidad: Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por la aplicación del mismo procedimiento analítico y la misma muestra en diferentes laboratorios. (CAMEVET)

Precisión intermedia: Precisión que expresa variaciones dentro del laboratorio. Incluye el mismo procedimiento de medición, misma ubicación, y mediciones repetidas sobre los mismos objetos o bien similares durante un periodo extendido de tiempo; puede incluir otras condiciones que involucren cambios. Los cambios pueden incluir diferentes días, nuevas calibraciones, calibradores, operadores y sistemas de medición.

Residuos de medicamentos veterinarios: Incluye los compuestos de origen y /o sus metabolitos, presentes en cualquier porción comestible de un producto animal, así como las impurezas relacionadas con el medicamento veterinario correspondiente. (CAMEVET)

Robustez: Es una medida de la fiabilidad del método analítico, frente a variaciones pequeñas pero intencionadas de los parámetros del método, proporcionando una medida de la misma durante su uso normal.

La UE lo define como la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales. (Decisión 657/2002)

Selectividad: La selectividad es la capacidad de un método para distinguir entre el analito que se mide y otras sustancias que pueden estar presentes en la muestra analizada. También llamada “especificidad”.

Anexo 1

Ejemplos de métodos para determinar el LOD y el LOQ

Un enfoque utilizado habitualmente se conoce como la definición de la IUPAC⁴. En ese procedimiento, el LOD se calcula como la media de los resultados de un ensayo con 20 muestras de control (de al menos 6 fuentes distintas) más 3 veces la desviación estándar de la media. El LOQ luego se convierte en la media de los mismos resultados más 6 o 10 veces la desviación estándar de la media. La evaluación de la exactitud y la precisión en el LOQ calculado proporcionará la evidencia final para determinar el LOQ. Si el %CV para la medición de repetibilidad en esa concentración es inferior o igual a los criterios de aceptación de la exactitud y la precisión (Sección 3.2 y 3.3), el LOQ calculado es aceptable.

En estudios farmacocinéticos, de bioequivalencia o estudios de residuos, los valores que están debajo del LOQ y por encima del LOD no deberían tenerse en cuenta para su análisis, a menos que su uso esté correctamente justificado.

Anexo 2

Métodos alternativos de Codex para determinar el LOD y el LOQ

Codex Alimentarius⁵ ha recomendado un método alternativo para determinar el LOD y el LOQ. Se cree que el método resuelve los problemas asociados con el método definido por la IUPAC (es decir, la alta variabilidad en el límite de medición nunca puede superarse) en el Anexo 1. En ese abordaje, el LOD se determina mediante un valor redondeado de la desviación estándar relativa (RSD) de reproducibilidad cuando se está fuera de rango (es decir, cuando $3 \times \text{RSD} = 100\%$; $\text{RSD} = 33\%$, redondeada a 50% debido a la alta variabilidad). Ese método se relaciona directamente con el analito en la matriz y no sólo con el analito.

Entonces, el límite de cuantificación (LOQ) corresponde al LOD y se define como el punto en el que la $\text{RSD} = 25\%$. Eso es congruente con el punto en el que el límite superior de detección confluye con el límite inferior de cuantificación. Al igual que en el método de la IUPAC definido en el Anexo 1, la evaluación de la exactitud y la precisión en el LOQ calculado proporcionarán la evidencia final para determinar el LOQ. Si el %CV de la medición de repetibilidad en esa concentración es inferior o igual a los criterios de aceptación de la exactitud y la precisión (Sección 3.2 y 3.3), el LOQ calculado es aceptable.

Anexo 3

Protocolo para la validación

La selectividad, el LOD y el LOQ se interrelacionan y se ven afectados por interferencias endógenas que pueden estar presentes en la matriz que se analiza. El LOD suele ser difícil de determinar en particular en ensayos de cromatografía con detección espectrométrica de masa en los que las muestras de control realmente proporcionan una respuesta cero en el tiempo de retención del analito. Sin respuesta, es imposible calcular la desviación estándar y, por lo tanto, es imposible determinar el LOD en función de la media más 3 veces la desviación estándar (SD). Aunque sea posible determinar la media más 3 veces la SD, con frecuencia se relaciona con el límite de detección del instrumento y no con el límite de detección del método. El siguiente protocolo está diseñado para determinar la especificidad, el LOD, el LOQ, la precisión y la exactitud en un estudio.

1. Recopilar 6 muestras control de distintos animales y realizar un estudio de detección de posible contaminación del analito.
2. a) Fortificar con el analito cada una de un mínimo de 3 muestras de las 6 muestras control al tiempo 0. Cada muestra debe ser seleccionada aleatoriamente de modo que cada una de ellas esté representada al menos una vez en cada concentración.
b) Las concentraciones para fortificar las muestras serán las siguientes:
 - b1) El LOD calculado (determinado durante el desarrollo del ensayo)
 - b2) 3 veces el LOD calculado (equivalente al LOQ calculado)
 - b3) Otras 3 concentraciones que conformarán el rango de concentración esperado y que deberá incluir el LMR, por ejemplo: 0,5 LMR; LMR y 2 LMR (Tabla 1).c) Repetir el proceso de fortificación el día 2 y el día 3, utilizando un segundo y un tercer grupo de 3 muestras cada uno (aleatoriamente), para que cada muestra seleccionada quede representada al menos una vez en cada concentración de las 6 muestras control.

Tabla 1. Ejemplo de diseño de estudio mínimo para permitir la determinación del LOD, el LOQ, la exactitud y la precisión (seis fuentes/animales: A, B, C, D, E y F) en un estudio

| Concentración de fortificación | Animal/Fuente ID† | | |
|--------------------------------|-------------------|----------------|----------------|
| | Día/Medición 1 | Día/Medición 2 | Día/Medición 3 |
| 0 (Control) | B, F, D | A, C, C | B, E, F |
| eLOD* | B, C, E | D, F, F | A, B, E |
| eLOQ (3 X eLOD)* | C, C, E | A, B, E | D, F, D |

| | | | |
|---|---------|---------|---------|
| Parte inferior del rango de validación | A, B, E | A, C, D | B, E, F |
| Mitad del rango de validación | B, C, E | C, E, F | A, D, F |
| Parte superior del rango de validación | A, B, B | D, F, F | A, C, E |
| <p>* eLOD = el LOD calculado generalmente se determina a partir de estudios preliminares realizados durante el desarrollo del método. El eLOQ = LOQ calculado se determina como 3 veces el eLOD.</p> <p>† cada fuente se selecciona aleatoriamente de modo que cada fuente quede representada al menos una vez en cada concentración en las 3 mediciones de validación.</p> | | | |

3. Analizar las 18 muestras cada día y evaluar los resultados frente a la curva estándar de calibración.
4. Indicar los resultados de concentración encontrada frente a la concentración incorporada los tres días del ensayo (análisis). Eso normalizará los resultados de los datos de los diferentes días y permitirá que todos los datos de las 3 mediciones se utilicen para determinar el LOD y el LOQ.
5. Establecer un límite de decisión, calculando los intervalos de predicción a ambos lados de los valores de la recta estimada por regresión lineal ponderada. (Ver gráfico siguiente)

El límite superior del intervalo de predicción estará fijado en función de la probabilidad de un error α (falso positivo).

El límite inferior del intervalo de predicción estará fijado en función de la probabilidad de un error β (falso negativo)⁶.

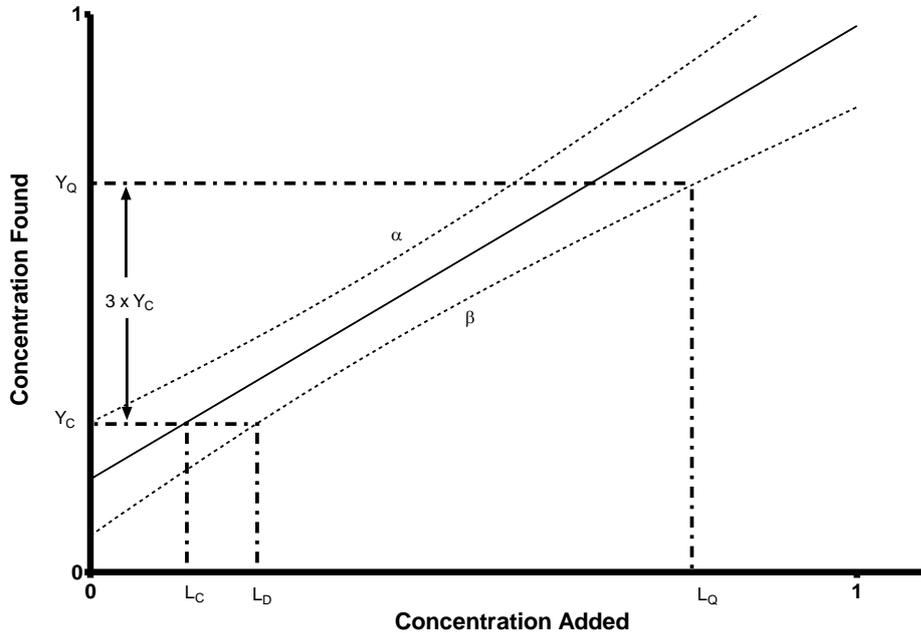
Normalmente, el intervalo de predicción de la regresión lineal se corresponde con un intervalo de confianza al 90%, es decir con un error α del 5% y un error β del 5%.

El punto en el eje de las Y intersectado por el límite superior del intervalo de confianza se denomina límite de decisión (Y_C), puede convertirse en concentración extrapolando este valor al punto correspondiente de la recta de regresión y desde allí hasta el eje de las X (L_C). Ese es el punto crítico en el que el 50% de las respuestas son reales.

El límite de detección (LOD) puede determinarse estimando la concentración correspondiente que deriva de extrapolar el valor de Y_C hasta el límite inferior del intervalo de confianza (β) y desde allí al eje de las X, punto que se denomina L_D .

6. Establecer un límite de determinación (Y_Q) multiplicando el límite de detección (Y_C) por 3 (la relación aceptada comúnmente entre el LOD y el LOQ es 3). El LOQ (L_Q) puede determinarse calculando el punto en el que la línea Y_Q cruza el límite inferior de confianza β que reduce la tasa de falso negativo para determinar el LOQ al nivel que se le asigna a β (normalmente 5%).
7. La reproducibilidad interna se puede determinar calculando el CV% en cada concentración evaluada. La exactitud se puede determinar comparando los resultados

obtenidos con los niveles de fortificación. Los criterios de aceptación de la exactitud y la precisión se proporcionan en las Secciones 2.2 y 2.3, respectivamente.



| | |
|---------------------|--------------------------------|
| Concentration found | Concentración hallada |
| Concentration added | Concentración de fortificación |

Este abordaje considera la interrelación entre la especificidad, el LOD y el LOQ. Al determinar el LOD y el LOQ utilizando 6 fuentes de matriz diferentes, la variabilidad ocasionada por la matriz así como la variabilidad del ensayo se toman en cuenta. Dado que la especificidad de los métodos de residuos depende de la posible interferencia de los componentes de la matriz, este abordaje también trata la especificidad y garantiza que la misma sea aceptable en el LOD y el LOQ determinados. Ese abordaje es congruente con la determinación del LOD y el LOQ especificada en las pautas VICH GL2 (Metodología de validación).

Ejemplo de conjunto de datos:

Se realizó un procedimiento de validación basado en la metodología mencionada anteriormente en un ensayo ELISA.

El suero porcino de control obtenido de seis animales diferentes fue fortificado con el analito a 0, 50, 150, 300, 600 y 1200 ng/ml, lo que generó un total de 36 muestras. Dado que se trató de un ensayo de suero y que fue relativamente fácil de analizar, los seis niveles de fortificación se analizaron en tres días. Si se hubiese tratado de muestras de tejido, hubiésemos seleccionado aleatoriamente 3 de los 6 animales (garantizando que cada uno de los 6 animales se analizaran al menos una vez) en cada uno de los niveles de fortificación para analizar durante los 3 días del ensayo un total de 18 muestras por día.

En función de esos tres días de análisis que incluyeron 108 ensayos en total (en el caso de ensayos de tejido hubiesen sido 54 ensayos en total) se realizaron las siguientes determinaciones: repetibilidad intradía e interdía, LOD y LOQ. Los datos sin procesar y los resultados de los análisis estadísticos se enumeran a continuación:

| Análisis | Nivel de fortificación, ng/ml | Resultados, ng/ml | | | | | |
|----------|-------------------------------|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | Animal A | Animal B | Animal C | Animal D | Animal E | Animal F |
| 1 | 0 | nr | nr | nr | nr | nr | nr |
| | 50 | 9 | 32 | 59 | 18 | 18 | 25 |
| | 150 | 162 | 160 | 148 | 145 | 133 | 128 |
| | 300 | 251 | 303 | 331 | 295 | 270 | 260 |
| | 600 | 508 | 514 | 592 | 513 | 568 | 609 |
| | 1200 | 907 | 1186 | 1162 | 1037 | 1050 | 1097 |
| 2 | 0 | nr | nr | nr | nr | nr | nr |
| | 50 | 26 | 41 | 40 | 36 | 37 | 27 |
| | 150 | 155 | 168 | 130 | 144 | 143 | 177 |
| | 300 | 234 | 251 | 335 | 307 | 251 | 247 |
| | 600 | 504 | 522 | 553 | 516 | 650 | 580 |
| | 1200 | 999 | 1030 | 1037 | 1020 | 985 | 996 |
| 3 | 0 | 1 | nr | 8 | nr | nr | 1 |
| | 50 | 39 | 60 | 71 | 50 | 68 | 48 |
| | 150 | 157 | 179 | 159 | 167 | 172 | 148 |
| | 300 | 290 | 277 | 336 | 319 | 299 | 278 |
| | 600 | 565 | 572 | 611 | 586 | 648 | 579 |
| | 1200 | 1071 | 1190 | 1218 | 1262 | 1246 | 1160 |

nr = no respuesta

Para la evaluación estadística de los datos previos se empleó un modelo simple en el cual se incluye el efecto fijo del tratamiento, los efectos aleatorios del análisis, la preparación de la muestra, etc. Dicho análisis se realizó de la siguiente manera:

- De manera de evaluar la exactitud del método, se calculó la Recuperación Porcentual (R%) de cada muestra dividiendo la concentración hallada por la concentración de fortificación antes del análisis (nivel de fortificación o concentración nominal) y multiplicando luego por 100.
- Con el fin de evaluar la variabilidad en el día (Repetibilidad) se calculó el Coeficiente de Variación Porcentual (CV%) dividiendo el desvío estándar por el promedio teniendo en cuenta los datos para todos los animales para cada nivel de fortificación y multiplicando luego por 100. Se calculó también la repetibilidad global como el CV% teniendo en cuenta

los valores para todos los niveles y todos los animales siempre para un mismo día (tratamiento).

- Con el fin de evaluar la variabilidad entre días (Reproducibilidad Interna) se calculó el CV% para un mismo nivel de fortificación pero utilizando los valores de R% obtenidos para todos los animales y todos los días (utilizando un total de 18 datos). Se calculó además la repetibilidad interna global como el CV% teniendo en cuenta todos los niveles de todos los días para todos los animales (utilizando en este caso un total de 72 datos). Este último resultado (CV% para todos los niveles y todos los días) es una buena medida de la variación que tendrá el método en la rutina, independientemente del nivel de fortificación, dado que se tienen en cuenta todos los factores que pueden afectar a la precisión del método.

Los valores de Recuperación Porcentual obtenidos son los siguientes:

| Análisis | Nivel de fortificación, ng/ml | Resultados, Recuperación % | | | | | |
|----------|-------------------------------|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | Animal A | Animal B | Animal C | Animal D | Animal E | Animal F |
| 1 | 0 | nr | nr | nr | nr | nr | nr |
| | 50 | 18,0 | 64,0 | 118,0 | 36,0 | 36,0 | 50,0 |
| | 150 | 108,0 | 106,7 | 98,7 | 96,7 | 88,7 | 85,3 |
| | 300 | 83,7 | 101,0 | 110,3 | 98,3 | 90,0 | 86,7 |
| | 600 | 84,7 | 85,7 | 98,7 | 85,5 | 94,7 | 101,5 |
| | 1200 | 75,6 | 98,8 | 96,8 | 86,4 | 87,5 | 91,4 |
| 2 | 0 | nr | nr | nr | nr | nr | nr |
| | 50 | 52,0 | 82,0 | 80,0 | 72,0 | 74,0 | 54,0 |
| | 150 | 103,3 | 112,0 | 86,7 | 96,0 | 95,3 | 118,0 |
| | 300 | 78,0 | 83,7 | 111,7 | 102,3 | 83,7 | 82,3 |
| | 600 | 84,0 | 87,0 | 92,2 | 86,0 | 108,3 | 96,7 |
| | 1200 | 83,3 | 85,8 | 86,4 | 85,0 | 82,1 | 83,0 |
| 3 | 0 | 1,0 | nr | 8,0 | nr | nr | 1,0 |
| | 50 | 78,0 | 120,0 | 142,0 | 100,0 | 136,0 | 96,0 |
| | 150 | 104,7 | 119,3 | 106,0 | 111,3 | 114,7 | 98,7 |
| | 300 | 96,7 | 92,3 | 112,0 | 106,3 | 99,7 | 92,7 |
| | 600 | 94,2 | 95,3 | 101,8 | 97,7 | 108,0 | 96,5 |
| | 1200 | 89,3 | 99,2 | 101,5 | 105,2 | 103,8 | 96,7 |

Nota: el nivel de fortificación de 50 ng/ml fue inferior al LOD y tanto los valores de R% como el CV% no cumplen con los criterios de aceptación por lo cual no se utilizaron para determinar la precisión del método.

Los resultados de la Repetibilidad para los valores de R% son los siguientes:

| Análisis | Nivel de fortificación, ng/ml | Repetibilidad por Nivel | | | Repetibilidad Global | | |
|----------|-------------------------------|-------------------------|----------|------|----------------------|--------------|-------------|
| | | DS | Promedio | CV% | DS | Promedio | CV% |
| 1 | 0 | | | | | | |
| | 50 | | | | | | |
| | 150 | 9,2 | 97,3 | 9,4 | 8,8 | 93,4 | 9,4 |
| | 300 | 10,1 | 95,0 | 10,6 | | | |
| | 600 | 7,5 | 91,8 | 8,1 | | | |
| | 1200 | 8,4 | 89,4 | 9,4 | | | |
| 2 | 0 | | | | | | |
| | 50 | | | | | | |
| | 150 | 11,6 | 101,9 | 11,4 | 11,4 | 92,2 | 12,3 |
| | 300 | 13,4 | 90,3 | 14,9 | | | |
| | 600 | 9,1 | 92,4 | 9,8 | | | |
| | 1200 | 1,7 | 84,3 | 2,1 | | | |
| 3 | 0 | | | | | | |
| | 50 | | | | | | |
| | 150 | 7,5 | 109,1 | 6,8 | 7,6 | 101,8 | 7,4 |
| | 300 | 7,8 | 99,9 | 7,9 | | | |
| | 600 | 5,2 | 98,9 | 5,2 | | | |
| | 1200 | 5,8 | 99,3 | 5,8 | | | |

Los resultados de la Reproducibilidad Interna para los valores de R% son los siguientes:

| Nivel de fortificación, ng/ml | Reproducibilidad Interna por Nivel | | | Reproducibilidad Interna Global | | |
|-------------------------------|------------------------------------|----------|------|---------------------------------|-------------|-------------|
| | DS | Promedio | CV% | DS | Promedio | CV% |
| 0 | | | | | | |
| 50 | | | | | | |
| 150 | 10,3 | 102,8 | 10,0 | 10,2 | 95,8 | 10,6 |
| 300 | 10,8 | 95,1 | 11,4 | | | |
| 600 | 7,7 | 94,4 | 8,2 | | | |
| 1200 | 8,5 | 91,0 | 9,4 | | | |

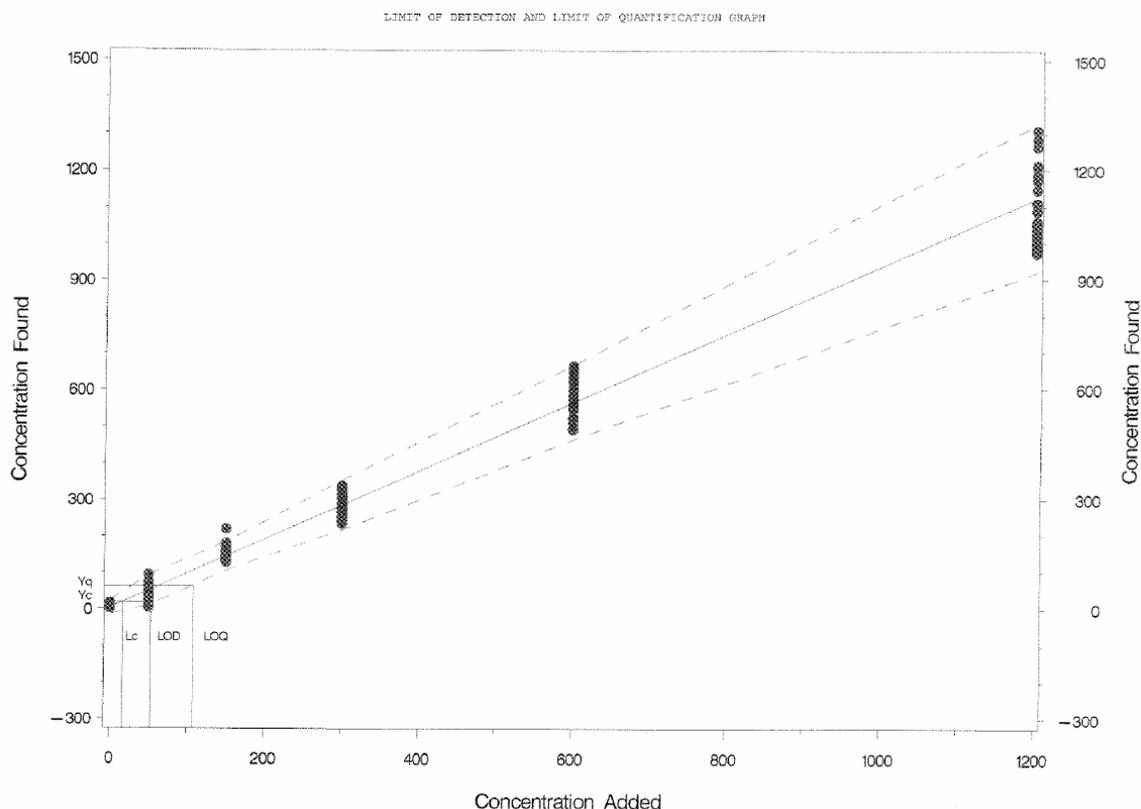
Nota: Debido a que no hay ninguna guía en donde se determine un % mínimo de recuperación, el mismo puede ser bajo (por ej: 40%) pero si el CV% en todas las concentraciones es menor al 20%, es aceptado. El ejemplo contrario sería: si tenemos una molécula con una recuperación del 95% pero un % de CV mayor al 20% significa que hay un problema metodológico.

Los resultados obtenidos para el LOD y LOQ son los siguientes:

LOD = 62 ng/ml

LOQ = 112 ng/ml

A continuación se proporciona una representación gráfica de la determinación del LOD y el LOQ:



| | |
|--|---|
| Limit of detection and limit of quantification graph | Gráfico de límite de detección y límite de cuantificación |
| Concentration found | Concentración hallada |
| Concentration added | Concentración de fortificación |

Esta es una manera directa de determinar en forma puntual la precisión, la exactitud, el LOD y el LOQ en un estudio durante tres días de validación.

La exactitud también puede determinarse como la pendiente del gráfico de Concentración Hallada vs Concentración de Fortificación.

El LOD y el LOQ coinciden con lo que se esperaría de una evaluación subjetiva de los datos y en base a estos resultados resulta lógico no haber tenido en cuenta el nivel de fortificación de 50 ng/ml en el cálculo de la precisión del método, dado que por debajo de 112 ng/ml (LOQ) no es posible efectuar una cuantificación con un nivel de confianza estadísticamente aceptable,

esto se verifica experimentalmente al observar los valores de concentración hallada (o de R%) y la precisión obtenida para dicho nivel, los cuales no cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

La precisión obtenida resulta más que aceptable si se tiene en cuenta que se trata de un procedimiento ELISA, y la misma cumple con los criterios de aceptación descritos en este documento. Durante la rutina del método, luego que se han obtenido entre 50 y 100 nuevos datos de R% (para diferentes niveles de fortificación) pueden actualizarse los valores de precisión, exactitud, LOD y LOQ.

Anexo 4

Robustez

Se puede utilizar el procedimiento de Youden y Steiner, que permite evaluar hasta siete variables con el análisis de sólo ocho muestras. El método es un diseño factorial fraccional y no permite detectar interacciones entre los diversos factores.

Cada variable se estudia mediante un valor (o cualidad cuando esto no es posible) alto (A, B,...G) y otro bajo (a, b,...g) y se diseñan ocho pruebas según el ejemplo de la Tabla 1. Los resultados se representan con letras desde “s” hasta “z”.

Tabla 1: Test de Robustez de Youden para un método analítico

| VALOR DE LAS VARIABLES | ANALISIS | | | | | | | |
|------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A, a | A | A | A | A | a | a | a | a |
| B, b | B | B | b | b | B | B | b | b |
| C, c | C | c | C | c | C | c | C | c |
| D, d | D | D | d | d | d | d | D | D |
| E, e | E | e | E | e | e | E | e | E |
| F, f | F | f | f | F | F | f | f | F |
| G, g | G | g | g | G | g | G | G | g |
| Resultados | s | t | u | v | w | x | y | z |

A partir de los resultados de los análisis de las muestras puede calcularse el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúsculas) y aquéllos que corresponden al valor más bajo (minúsculas). Así, el efecto de cambio del Factor “A” a “a” se mide por la diferencia:

$$Dif = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4}$$

Es decir, la media de los resultados (s+t+u+v) equivale a “A” porque las restantes variables presentes en estos cuatro resultados se anulan entre sí como consecuencia de que existen siempre dos mayúsculas y dos minúsculas de cada variable. Análogamente, la media de los resultados (w+x+y+z) equivale a “a”.

Se calcula el efecto de cada uno de los factores. Finalmente el efecto de cambio de "G" a "g" se mide por la diferencia (s+v+x+y)/4 - (t+u+w+z)/4.

Al comparar los dos valores medios se conoce la influencia de la variable en el estudio.

Para cualquier otra variable se puede proceder de manera similar, como muestra la Tabla 1.

Estableciendo las siete comparaciones posibles (A-a,...G-g) puede conocerse el efecto de cada variable; cuanto mayor sea la diferencia, mayor influencia tendrá dicha variable en el método analítico. Si cualquiera de las diferencias entre los promedios de subgrupos de cuatro es mayor que $\sqrt{2} * DS$, estas variables recibirán especial atención al redactar el método, remarcando la necesidad de un estricto control para obtener resultados de calidad; es decir si:

$$Dif > \sqrt{2} * DS$$

Donde DS = desviación estándar entre los replicados llevados a cabo en las condiciones de reproducibilidad interna (validación) al mismo nivel de fortificación, entonces dicha variable se considerará crítica.

Nota 1: Los factores a estudiar no deben ser necesariamente siete; puede considerarse un número menor de variables. Esto no afectará el balance del diseño del experimento siempre que se lleven a cabo los ocho ensayos indicados.

Nota 2: una información adicional de este Test de Youden es que la desviación estándar de los resultados “s” a “z” constituye una medida excelente de la imprecisión previsible del método cuando se utiliza para el análisis de rutina, ya que este procedimiento introduce deliberadamente el tipo de variación en las variables que puede esperarse que ocurra durante el empleo normal del método.

Periodicidad de revisión

5 años

¹ Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods, Part III Attributes of analytical Methods for Residue of Veterinary Drugs in Foods, p. 41, CAC/GL 16-1993.

² Codex Guidelines for the Establishment of a Regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods, Part III Attributes of analytical Methods for Residue of Veterinary Drugs in Foods, p. 42, CAC/GL 16-1993.

³ Guidance for industry: Bioanalytical method validation U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001, BP.

⁴ IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

⁵ Codex Alimentarius Procedural Manual, 15th Ed., Twenty-eight Session of the Codex Alimentarius Commission, Rome, 2005, p 81.

⁶ Zorn ME, Gibbons RD, Sonzogni WC. Weighted Least-Squares Approach to Calculating Limits of Detection and Quantification by Modeling Variability as a Function of Concentration, *Anal Chem* 1997, 69, 3069-3075.