

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

XX Seminario sobre Armonización del Registro y Control de
Medicamentos Veterinarios
Comité de las Américas de Medicamentos Veterinarios (CAMEVET)
Ottawa, Canadá
26 – 29 de agosto de 2014

Discursos de apertura

El Dr. Luis Barcos, Representante Regional de la OIE para las Américas, dio la bienvenida a los participantes, junto a la Dra. Montserrat Arroyo, Representante Sub regional de OIE para Centroamérica, el Dr. Enrique Argento, Secretario del CAMEVET, el Dr. Glen Gifford, Punto Focal de Medicamentos Veterinarios de la OIE por Canadá, la Sra. Jean Szkotnicki, Presidente del Instituto Canadiense de Salud Animal -CAHI, la Dra. Martine Dubuc, Delegada ante la OIE y Vicepresidente del CFIA, y el Dr. Harpreet Kochhar, Jefe de los Servicios Veterinarios de Canadá.

El Dr. Barcos destacó la importancia de los productos veterinarios, y la prioridad que la OIE da al tema de los antimicrobianos y su resistencia.

Asimismo, la Dra. Jean Szkotnicki, resaltó las semejanzas entre Latinoamérica y Canadá, en cuanto a los acuerdos de comercio.

La Dra. Martine Dubuc destacó que la atención que se brinda al el uso de productos veterinarios es cada vez mayor, tanto a nivel del público consumidor como de las autoridades

Asunción de Presidencia

El Dr. Glen Gifford asumió la Presidencia del Seminario.

Sesión I – Relaciones del CAMEVET y aplicación de los documentos armonizados.

Informe de la 82ª Sesión General de la OIE

El Dr. Martín Minassian, Asistente Técnico de la Representación Regional de la OIE para las Américas, realizó una presentación que incluyó los temas tratados en la 82ª Sesión General de la OIE con relevancia en el ámbito del CAMEVET.

Recordó que el acuerdo de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio reconoce a la OIE como autoridad de referencia a los fines de la resolución de controversias en lo que refiere a sanidad animal y zoonosis, y puntualizó que la Sesión General determina la política de la OIE y su funcionamiento.

Con referencia a la resistencia de antimicrobianos, destacó el avance en la creación de una base de datos mundial sobre el uso de antimicrobianos en animales, en seguimiento a las recomendaciones de la Conferencia Mundial de la OIE sobre el uso responsable y prudente de antimicrobianos.

Frente a la posibilidad que el CAMEVET pueda tener una participación más activa en el

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

proceso de revisión de las propuestas de normas de la OIE, y en virtud que las Comisiones Especializadas se reúnen entre los meses de agosto y septiembre para preparar los documentos y difundirlos, y entre febrero y marzo para analizar los comentarios recibidos, el Dr. Luis Barcos propuso la modificación de la fecha de los Seminarios del CAMEVET al mes de noviembre. De tal modo, esto permitirá que se preparen recomendaciones para que los Delegados de cada uno de los países puedan considerar para proponer a la OIE las posiciones de sus países.

La propuesta fue aceptada por unanimidad.

Estado de implementación de los documentos armonizados en los países miembros.

El Dr. Enrique Argento presentó los resultados de una encuesta enviada a los países de las Américas, que reflejó el estado de implementación de los documentos armonizados.

Recordó la necesidad de contar con las respuestas de los países, ya que esta encuesta permite conocer el impacto del trabajo del Comité.

Se destacó que si bien en muchos casos los documentos armonizados no son incorporados en las reglamentaciones nacionales, son utilizados como un sustento técnico, o que son aplicados sin incorporarlos a las reglamentaciones, por lo que es importante contar con dicha información. Para ello, se propuso el criterio del uso referencial de los documentos armonizados, dejando de lado el concepto de internalización.

Se plantearon las diferencias entre la información presentada con respecto a la aplicación de algunos documentos armonizados y la situación que fue planteada por el sector industrial. Se tomó el ejemplo de la Guía de rotulado, que fue respondida como aplicada en casi todos los países que dieron respuesta al cuestionario, pero que sigue presentando un problema mayor.

Modificación del documento con respecto a las etapas en la armonización de los documentos del CAMEVET

La Secretaría comunicó a los participantes que se elaboró un proyecto de modificación del documento armonizado titulado “Procedimiento para elaboración, estudio, aprobación, adopción, identificación y seguimiento de documentos armonizados de CAMEVET”, con el fin de mejorar la interpretación del estado de tramitación de los documentos. Para ello, la Mesa Ejecutiva se hará cargo de la modificación de dicho procedimiento.

Comunicaciones y Página Web

Frente a la consulta realizada durante el Plenario en temas relacionados a la actualización de la página Web del CAMEVET, el Representante Regional comentó que esta demora en la actualización será subsanada en el mes de noviembre de este año.

Presentación de los resultados del Taller dirigido a los Puntos Focales Nacionales

El Dr. Glenn Gifford presentó las conclusiones del Taller dirigido a los Puntos Focales Nacionales de la OIE para los Productos Veterinarios, celebrado con anterioridad al Seminario del CAMEVET.

Comentó que se presentaron temas relacionados a resistencia a los antimicrobianos, el

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

registro de kits de diagnóstico y la resistencia a los antiparasitarios. Destacó que este último tema es de gran importancia, dada la experiencia de la región al respecto.

También se destacó la importancia de tomar medidas para evitar la falsificación de productos, teniendo en cuenta lo que ha sucedido en el campo de la industria farmacéutica humana.

Presentación del informe de la reunión del sector industrial

El Sr. Guillermo Leonel Rodas, Presidente de Federación Centroamericana de Industria de Medicamentos Veterinarios - FIVETCA presentó las conclusiones de la reunión mantenida entre los representantes del sector privado, cuyo informe se incluye como **Anexo**.

Manifestó que se presentaron temas relacionados a la necesidad de evitar la duplicación de ensayos, sobre todo en lo referido a residuos, eficacia, inocuidad y seguridad, cuando hay disponibles resultados de ensayos adecuados realizados con anterioridad o en otros países, o cuando existe abundante información bibliográfica sobre el tema.

Sesión II - Documentos de trabajo

El Dr. Argento reiteró a los participantes, la necesidad de cumplir con los plazos establecidos para la emisión de comentarios ya que esto provoca demoras en la circulación y aprobación de los documentos de trabajo.

Guía para el registro de medicamentos homeopáticos veterinarios

La representación de SINDAN asumió la coordinación del Grupo de Trabajo y la responsabilidad de presentar el documento final, dada la imposibilidad del sector oficial de Colombia de dar continuidad a esta tarea.

El Sr. Milson Pereira da Silva explicó que en Brasil la ley obliga al registro de todo tipo de productos y que existen ocho laboratorios que producen medicamentos homeopáticos de uso veterinario. Comentó asimismo que el no registrar a los productos aumenta el riesgo de la piratería.

A partir de las demoras en el avance del documento, se propuso y aceptó la circulación del documento con las observaciones a los miembros de CAMEVET, con un plazo de 90 días para la recepción de comentarios.

A la vez, se propuso que, si luego de la circulación no hay comentarios se podría establecer algún mecanismo para obtener el consentimiento de los Puntos Focales por vía electrónica.

El representante del sector oficial de Canadá solicitó que en los casos en los que no existieran observaciones, éstas fueran expresadas formalmente, para dar su acuerdo al documento.

Guía para el registro de productos veterinarios nutracéuticos /Complementos dietarios

El Dr. Carlos Rufrano, coordinador del Grupo de Trabajo, presentó la versión final del Documento, en status de Trámite III, documento que fue re circulado durante 60 días, de

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

acuerdo a lo acordado durante el XIX Seminario en Panamá.

Algunos países destacaron que no podrían aprobar, ni implementar este documento, por encontrarse fuera de su ámbito de autoridad, para lo cual se coincidió que cada Punto Focal haga llegar el documento al sector pertinente de sus países para su consideración.

Guía de prueba de potencia para vacunas bovinas que contengan en su formulación virus parainfluenza 3 bovino (PI-3)

Al no contar con la presencia del disertante designado en el programa, se postergó el tratamiento de este tema. El documento permanecerá en el status de Trámite IV, para su presentación durante el próximo Seminario.

Guía de buenas prácticas de almacenaje, transporte y distribución de productos de uso veterinario

El Dr. Milson da Silva Pereira, coordinador del Grupo de Trabajo, presentó la versión final del documento, en estado de Trámite III.

A partir de la presentación realizada, los representantes del Sector Oficial de México y Uruguay manifestaron que no vieron reflejados algunos de sus comentarios.

En base a esto, se recordó a los coordinadores de los Grupos de Trabajo que es responsabilidad de éstos el justificar la no inclusión de comentarios recibidos, y comunicarlo a aquellos que los hubieran hecho.

A partir de esto, el documento será nuevamente circulado, con la inclusión de las observaciones propuestas por de México y Uruguay, con un plazo de 90 días para recepción de las observaciones

Guías relativas al cálculo de periodos de retiro:

- 1º. Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles,***
- 2º. Guía Técnica para la Conducción de Estudios de Metabolismo y Cinética de Residuos de agentes farmacológicos de uso Veterinario en Animales Productores de alimentos -Estudios de Eliminación de Residuos para Establecer Períodos de retiro del medicamento veterinario***
- 3º. Guía para la validación de los métodos analíticos para la determinación de residuos en matrices biológicas de origen animal***

El Dr. Carlos Francia como coordinador del Grupo de Trabajo presentó la versión final de los documentos, en status de Trámite III. Estos documentos tuvieron una primera circulación por 90 días dentro del grupo de trabajo y una segunda circulación por 60 días entre todos los miembros del CAMEVET.

No habiendo recibido observaciones y habiendo cumplido con los plazos establecidos, el documento fue sometido a votación y aprobado por unanimidad.

Las Guías armonizadas se incluyen como **Anexo**.

Seguridad de vacunas en bovinos, Guía para estudios con vacunas inactivadas.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Al no contar con la presencia del disertante designado en el programa, se posterga el tratamiento de este tema. El documento permanecerá en el status de Trámite IV para su presentación durante el próximo Seminario.

Guía de prueba de potencia para vacunas bovinas inactivadas que contengan rotavirus bovino, agente viral asociado a la diarrea neonatal del ternero

Al no contar con la presencia del disertante designado en el programa, se posterga el tratamiento de este tema. El documento permanecerá en el status de Trámite IV, para su presentación durante el próximo Seminario.

Rotulado

El Dr. Niels Scherling realizó una presentación, en donde destacó la problemática de la falta de armonización de los requisitos de rotulado por los países, que no ha sido resuelta a pesar de contar con la Guía de Rotulado, que fuera armonizada desde hace más de 10 años.

Informó que se realizó una encuesta que solamente fue respondida por 8 países. Se destacó la necesidad que los países dieran respuesta a este tipo de solicitudes.

El Grupo de Trabajo ya formado, coordinado por CAPROVE e integrado por ALANAC, ANVET, AVISA, INFARVET/CANIFARMA, CLAMEVET, FENALCO y SINDAN continuarán desarrollando el proyecto, que tiene como fin de orientar la aplicabilidad del documento armonizado de Rotulado de Productos Veterinarios y diseñar una solución a este problema que resulta muy gravoso para la industria de todos los países miembros.

Estabilidad

La delegación de SINDAN (Brasil) presentó una propuesta de modificación a la guía de estabilidad recientemente aprobada, en el XVIII Seminario, en el año 2012.

Destacaron haber detectado errores en el texto, que serán corregidos, y se realizaron algunas propuestas de modificación al documento aprobado

Las sugerencias fueron derivadas al grupo de trabajo formado por los sectores oficiales de Argentina, Colombia y Uruguay, y el sector privado, con CAPROVE, CLAMEVET, APROVET, CEV y ADIPRAVE, para su consideración y que sea circulada una propuesta al respecto.

A partir de lo anteriormente detallado, el documento en revisión ingresa al estado de Trámite VI.

Participación del CAMEVET en el Foro de divulgación de VICH

El Dr. Enrique Argento realizó una presentación relativa a su participación en representación del Comité, revisando el historial de las reuniones de este de Foro, e informó lo ocurrido en las reuniones de noviembre de 2013 en Auckland, Nueva Zelanda, y junio de 2014 en Bruselas, Bélgica.

Destacó la importancia de la participación de los representantes de los países del continente americano en las reuniones, así como la participación del CAMEVET en el Grupo

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

de Trabajo formado para coordinar las actividades de capacitación del VICH, y de la Dra. Laura Sbordi en los Grupos de Trabajo de Expertos en residuos en miel, y productos combinados.

Con respecto a la revisión de la guía del VICH sobre estabilidad de productos veterinarios, se envió la guía armonizada en el CAMEVET, que cubre zonas climáticas tropicales no incluidas en ésta y se remitió a los miembros de CAMEVET el documento de concepto elaborado por el grupo de trabajo con modificaciones para comentarios.

En la reunión de Bruselas se destacó que el mayor interés de los miembros del VICH es el reconocimiento de las guías y que no se pretende imponer su aplicación al resto de los países no miembros.

Se destacó que, por iniciativa de las delegaciones de CAMEVET y de Argentina, se detectó la necesidad de diferenciar los planos de comunicación entre el nivel técnico, y el nivel político. Esto es importante porque el poder político es quien tiene la posibilidad de asignar los recursos imprescindibles para las tareas de registro y control de medicamentos veterinarios.

Las delegaciones de México y de Brasil, invitadas al Foro de Vinculación, expresaron su interés en continuar con su participación activa.

Se destacó la importancia de generar un consenso previo a la participación en las reuniones para sostener una posición regional. Para ello, la Secretaría asumirá la responsabilidad de coordinar este mecanismo.

La delegación oficial de Argentina expuso su satisfactoria experiencia en la participación en el Foro de Vinculación y en los grupos de trabajo. Asimismo, manifestó que utilizan las guías como referencia, manteniendo la soberanía del país y en base a la normativa local.

El Dr. Argento informó acerca de la invitación por parte de Estados Unidos de América, para realizar la reunión del Steering Committee y del Outreach Forum, en Buenos Aires en febrero de 2015. Comentó que la Mesa Ejecutiva aprobó esta propuesta por considerarla muy importante para la región. Finalmente, puntualizó que en la reunión del Steering Committee efectuada en Bruselas se decidió postergar a ésta hasta febrero de 2017.

Mesa Redonda, aplicación de las Guías del VICH

Las delegaciones del sector privado de Estados Unidos de América y Canadá, y la Dra. Bárbara Freischem, Comisionada del Departamento Científico y Técnico de la OIE y representante de la OIE ante el VICH, expusieron los criterios de aplicación de las guías del VICH y su utilidad.

Se destacó que la utilización de las mismas es voluntaria en aquellos países no miembros, tratándose de documentos técnicos que no se incorporan a la legislación para facilitar su actualización ante los avances de la ciencia.

Se reconoce, en general, el valor de las guías como material de referencia permanente.

Políticas de Genéricos

Se describió la política respecto a medicamentos veterinarios genéricos de Canadá desde

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

la visión del sector oficial y la industria, tanto desde una perspectiva global como puntual de una empresa dedicada a la elaboración de este tipo de productos.

Se destacó la importancia de la guía para el registro de este tipo de productos adoptada en el VICH, que transparentó el procedimiento y facilitó el proceso, permitiendo el acceso de nuevos productos al mercado.

La delegación de la industria de Brasil (SINDAN) expuso la situación en su país, con una Ley que no ha sido reglamentada y que no es adecuada para el mercado veterinario. Remarcó además que para el desarrollo de este tipo de industria sería necesario un estímulo del gobierno, como ha sucedido con la industria humana.

La Dra. Margarita Pinto, Vocal de la Mesa Ejecutiva por el sector privado, expuso las características del proceso de desarrollo y registro de los productos veterinarios clasificados como innovadores.

A partir de las presentaciones realizadas, se propuso y aceptó la creación de un grupo de trabajo para realizar una revisión de la legislación existente, con el fin de producir un documento que desarrolle los aspectos relacionados con el referido tema. Teniendo en cuenta que la bioequivalencia se encuentra íntimamente relacionada con la temática de los productos genéricos, se sugirió que el tratamiento de estos dos temas tendría que realizarse en paralelo y en el mismo Grupo de Trabajo.

El Grupo de trabajo será coordinado por la delegación oficial de México, e integrado por las delegaciones oficiales de Guatemala, Chile, Uruguay, Costa Rica, además de INFARVET, CEV, ADIPRAVE, ALANAC, CLAMEVET, SINDAN, y la Federación de Industria Veterinaria Centroamericana -FIVETCA.

Mesa Redonda y discusión: Presente y futuro del CAMEVET Plan Estratégico del CAMEVET: Estado de avances

El Dr. Federico Luna, Coordinador del Grupo de trabajo para el desarrollo del Plan Estratégico CAMEVET 2015 – 2020 realizó una presentación sobre los avances en el tema.

El Dr. Luna Informó que se circuló una encuesta, recibiendo respuestas de tan sólo el 18 % de los países, lo cual es insuficiente para la elaboración de un plan.

A partir de ello, se propuso y aceptó una nueva circulación de la encuesta, solicitándose la participación en la misma. Asimismo, se comentó que la elaboración del proyecto tendrá en cuenta el futuro plan estratégico de la OIE, en actual revisión.

Sesión III - Documentos de trabajo

Uso de Productos Veterinarios en Acuicultura

Se desarrolló una presentación respecto al uso de este tipo de productos, dado que revisten una creciente importancia.

Entre otros, se describieron programas de desarrollo de productos para el control de ectoparásitos del salmón.

Dado el desarrollo de la acuicultura en distintos países de la región, con una expresión de alto nivel en Chile, se consideró oportuno reactivar al grupo de trabajo formado en el

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Seminario realizado en el año 2013, para continuar tratando estos temas.

El grupo estará coordinado por la delegación oficial de Canadá, e integrado por los sectores oficiales de Chile, Costa Rica, México, Perú y el Centro Cubano para la Ingeniería Genética y la Biotecnología, así como los representantes de ANVET, ALANAC, CAPROVE, FENALCO y SINDAN

Propuesta de nuevos temas de trabajo

Fueron propuestos varios nuevos temas de trabajo que se mencionan a continuación, y para lo cual se formaron los respectivos Grupos de Trabajo que redactarán los primeros documentos que ingresarán al status de Trámite II.

Criterios de aplicación de las definiciones para el registro de producto innovador, genérico, similar y nuevo

En función de lo decidido respecto a la preparación de un documento de trabajo sobre productos genéricos de uso veterinario, se consideró que el mismo Grupo de Trabajo sea quien se haga cargo de la preparación de un apartado conteniendo a los criterios de aplicación.

Especies y usos menores

El Grupo será coordinado por SINDAN. En el Grupo participarán los representantes de los sectores oficiales de Chile, Cuba, Ecuador y Uruguay, así como ADIPRAVE, ALANAC, CEV, CLAMEVET y FENALCO, por el sector privado.

Promotores de crecimiento

El Grupo de Trabajo está coordinado por SINDAN, conformado además por los representantes de Ecuador, el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba, ADIPRAVE, ALANAC, ANVET, AVISA, CEV, CLAMEVET, y la Cámara de Insumos Agropecuarios de Costa Rica.

Bioequivalencia

Se dará continuidad a este grupo coordinado por CAPROVE, e integrado por los representantes oficiales de Chile, México, Perú y Uruguay, así como de ADIPRAVE, ALANAC, CEV, CLAMEVET, FENALCO SINDAN e INFARVET.

Instructivos para el completado de los formularios CAMEVET para el registro de productos farmacológicos y biológicos

El Dr. Federico Luna, representante de Argentina y coordinador del Grupo de Trabajo, informó que ya se encuentra redactado el primer borrador para ser circulado dentro del grupo de Trabajo conformado por SINDAN. CLAMEVET, Ecuador (Oficial) CAPROVE y la Dra Liliana Revollo.

El Dr. Benigno Alpizar Montero informó que dispone de un segundo borrador sobre productos farmacológicos para entregar al grupo de trabajo

Kits de diagnóstico

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

El Grupo de Trabajo será coordinado por la delegación oficial de Estados Unidos, y estará conformado por las delegaciones oficiales de Canadá, México, Guatemala, Cuba, INFARVET, SINDAN Y CLAMEVET.

Informe de gastos, estado Financiero y presupuesto 2013/2014

Recursos disponibles al 27 de agosto de 2014 54.092,00 USD

Ingresos

Inscripción al XX Seminario 40.000,00 ARG 26.700,00 USD
(USD 300/USD 400 participante)

Recursos disponibles al cierre del Seminario 8.171,92 ARG¹ 80.792,00 USD

Presupuesto para el ejercicio 2014/2015

Egresos

Gastos fijos

→ Personal 8.400,00 USD

Gastos variables

→ Fondo de apoyo a Puntos Focales 3.000,00 USD

→ Participación en reuniones del VICH Washington Febrero 2015 3.500,00 USD

Elección de Miembros de la Mesa Ejecutiva

De acuerdo a lo expresado en el Reglamento, se procedió a la elección de una nueva Mesa Ejecutiva.

- **Presidente:** Dra. María Eugenia Paz
- **Vocales del sector oficial:**

Vocal Honorario: Dr. Glenn Gifford

1. **Argentina:** Dr. Federico Luna
2. **México:** Dra. Ofelia Flores
3. **Paraguay:** Dra. Gloria Alarcón
4. **Chile:** Dr. Fernando Zambrano
5. **El Salvador:** Dra. Delfy Mariana Gochez Alvarenga -Vocal suplente-

- ***Vocales por parte de los miembros adherentes:***

1. **CEV:** Dra. Mercedes Etcheverry
2. **FIVETCA:** Sr. Guillermo Rodas Serrano
3. **CAPROVE:** Dr. Carlos Francia
4. **CLAMEVET:** Dr. Carlos Rufrano
5. **SINDAN:** Dr. Milson da Silva Pereira

¹ 31.828,08 ARG en concepto de pasajes a XX Seminario, Secretario y Asistente CAMEVET

Los cargos serán vigentes hasta la finalización del XXII Seminario, a desarrollarse en el año 2016.

Sede de la próxima reunión

Se acepta la propuesta de Guatemala para la realización del próximo Seminario en ese país, durante la segunda semana de noviembre de 2015

Asimismo, se aceptó la propuesta la delegación Oficial de México para realizar el XXII Seminario del año 2016 en su país.

Listado de Anexos

- I. Acta de la reunión del sector industrial
- II. Documentos armonizados:
 - i. Guía técnica para la conducción de estudios de metabolismo y cinética de residuos de agentes farmacológicos de uso veterinario en animales productores de alimentos - Estudios de eliminación de residuos para establecer períodos de retiro del medicamento veterinario
 - ii. Guía para la validación de los métodos analíticos para la determinación de residuos en matrices biológicas de origen animal
 - iii. Guía para el cálculo del período de retiro en tejidos comestibles

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Lista de siglas utilizadas en el documento

ADIPRAVE:	Asociación de las Industrias de Productos Agroquímicos y Veterinarios (Uruguay)
ALANAC:	Asociación de Laboratorios Farmacéuticos Nacionales (Brasil) (Associação dos Laboratórios Farmacêuticos Nacionais)
ANVET:	Asociación Nacional de Laboratorios Veterinarios (Chile)
APROVET:	Asociación Nacional de Laboratorios de Productos Veterinarios (Colombia)
AVISA:	Asociación Venezolana de la Industria de Salud Animal Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica (México)
CAHI	Instituto Canadiense de Salud Animal - Canadian Animal Health Institute
CAMEVET:	Comité de las Américas de Medicamentos Veterinarios
CAPROVE:	Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios
CEV:	Cámara de Especialidades Veterinarias (Uruguay)
CFIA:	Canadian Food Inspection Agency
CLAMEVET:	Cámara de Laboratorios Argentinos Medicinales Veterinarios
FDA:	U S Food and Drug Administration - Administración de Medicamentos y Alimentos
FIVETCA:	Federación de Industria veterinaria Centroamericana
INFARVET:	Industria Farmacéutica Veterinaria – Canifarma (México)
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal
OIRSA:	Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria
SENASA:	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Argentina)
SINDAN:	Sindicato Nacional da Industria de produtos para Saúde Animal
VICH:	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

ANEXO I

REUNIÓN PLENARIA DE LA INDUSTRIA Ottawa, Canadá agosto 2014

El día 25 de Agosto de 2014, se llevó a cabo la reunión de la Plenaria de la Industria en la cual estuvo presente la representación de los países presentes en el CAMEVET.

Los principales puntos que se manifestaron durante el desarrollo de esta reunión fueron:

1. Mejorar la comunicación entre la Industria y las autoridades para establecer un diálogo abierto con nuestras autoridades para fortalecer el Plan Estratégico.
2. Rotulado: Se solicita que las autoridades atiendan las recomendaciones de internalizar documentos Camevet, con el fin que los rotulados no se conviertan en una barrera comercial.
3. Normas VICH: La Industria espera que se reconozca el VICH como una recomendación, más no que se apliquen en nuestros países, esperando que se internalicen prioritariamente las normas Camevet.
4. Fijar criterios en reuniones en conjunto, entre Industria y Sector Oficial para la aplicación de normas, Para evitar discrecionalidad y exceso de exigencias entre los diferentes funcionarios. Recomendación: Crear documentos respetando acuerdos alcanzables para fijar estos criterios.
5. La Industria sugiere no repetir localmente una serie de estudios que ya han sido hechos con anterioridad a las moléculas (residuos, eficacia, inocuidad etc.), siempre y cuando haya sustento técnico y/o que existan antecedentes con bases Científicas sobre las moléculas que se comercializan y que son ampliamente conocidas.
6. Combinaciones de medicamentos; Se solicita dar retroalimentación a la mesa de trabajo de VICH (principalmente en cuanto a la posición de China al respecto).
7. Creación de la Federación Latinoamericana de la Industria Veterinaria “FLAIVET”: Se creó con el fin de unificar criterios y posiciones de las Industrias de Medicamentos Veterinarios Nacionales de la región ante las autoridades regulatorias.
8. Capacitación: Se solicita crear una comisión para generar programas de capacitación en temas regulatorios y de buen uso de los medicamentos veterinarios al sector oficial e industrial, con miras a alinear criterios y estandarizar el entrenamiento para ambas partes.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

ANEXO II.i

Septiembre 2010
Revisión: Abril 2013

GUÍA TÉCNICA PARA LA CONDUCCIÓN DE ESTUDIOS DE METABOLISMO Y CINÉTICA DE RESIDUOS DE AGENTES FARMACOLÓGICOS DE USO VETERINARIO EN ANIMALES PRODUCTORES DE ALIMENTOS

ESTUDIOS DE ELIMINACIÓN DE RESIDUOS PARA ESTABLECER PERÍODOS DE RETIRO DEL MEDICAMENTO VETERINARIO

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Tabla de contenidos

Prólogo	4
1. Introducción	6
1.1 Objetivo de la guía	6
1.2 Antecedentes	6
2. Alcance.....	6
3. Glosario	7
4. Estudios de eliminación del residuo marcador.....	7
4.1. Medicamento veterinario en evaluación	9
4.2 Animales y cría de animales	9
4.2.1. Estudios intramamarios	10
4.2.2. Otros parámetros	10
4.3. Número de animales para el estudio	10
4.3.1. Rumiantes, porcinos y equinos para estudios de residuos en tejidos	10
4.3.2. Animales lecheros para estudios de residuos en leche	10
4.3.3. Aves de corral	11
4.4. Vía de administración	11
4.4.1. Guía general	11
4.4.2. Consideraciones para medicamentos veterinarios elaborados para múltiples vías de administración	11
4.4.3. Recomendaciones para la aplicación de un medicamento veterinario por aspersión	11
4.5. Sacrificio Animal	12
4.6. Muestreo	12
4.6.1. Consideraciones generales	12
4.6.2. Sitios de inyección	14
4.6.3. Otras consideraciones	15
4.6.4. Muestreo de leche	16
4.6.5. Muestreo de huevos	16
5. Recomendaciones para los medicamentos veterinarios propuestos para períodos de retiro de 0 días	16
6. Estudios de comprobación de período de retiro	17
6.1. Criterios para determinar la necesidad de un estudio de residuos o de un estudio de comprobación de período de retiro	17
6.2. Interpretación de los resultados del estudio de comprobación de período de retiro	17
6.3. Diseño experimental	18
7. Método analítico para ensayos de residuos marcadores	18

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

1. Introducción

Como parte del proceso de aprobación de los medicamentos veterinarios para animales productores de alimentos, las autoridades reguladoras solicitan datos de estudios de eliminación del residuo marcador a fin de establecer períodos de retiro apropiados en productos comestibles, incluidos la carne, la leche, los huevos y la miel. El objetivo de esta guía es dar recomendaciones sobre el diseño de estudios que faciliten la aceptación universal de los datos generados sobre la eliminación de residuos para alcanzar ese requerimiento.

Las recomendaciones generales que se establecen se aplican a la mayoría de las situaciones en las que es necesario determinar un período de restricción de uso. Con todo, es imprescindible que se tenga en cuenta que pueden existir situaciones en las que resulten inadecuadas o inaplicables. En esos casos, la autoridad sanitaria evaluará los diseños específicos que se propongan toda vez que estén debidamente fundamentados.

1.1. Objetivo de la guía

El presente trabajo intenta, basándose en antecedentes reconocidos, proponer protocolos para la conducción de estudios de eliminación de residuos para establecer períodos de retiro de medicamentos veterinarios. Éstos protocolos han sido adaptados a las características de la realidad en los países miembros del CAMEVET y podrían ser útiles para otros países.

1.2. Antecedentes

VICH GL 48 (November 2009) – Marker Residue Depletion Studies.
EMA/CVMP/036/95-Final (January 1997). Approach Towards Harmonization of
Withdrawal Periods.

2. Alcance

Para registrar un medicamento veterinario destinado a animales productores de alimentos, se recomiendan estudios de eliminación del residuo marcador en la especie de destino a fin de:

- demostrar la eliminación del residuo marcador luego del cese del tratamiento farmacológico hasta alcanzar el nivel de seguridad permitido (ej. tolerancia o límite máximo de residuos [LMR]).
- Generar la debida información para establecer períodos de retiro apropiados a fin de asegurar la inocuidad de los alimentos

La idea es que un estudio de eliminación de residuos (por cada especie), llevado a cabo dentro de cualquier región global, sea suficiente para satisfacer los requisitos de información para establecer períodos de retiro apropiados para un medicamento específico para animales productores de alimentos. La guía comprende las especies más comunes, eso es, bovinos, porcinos, ovinos y aves; sin embargo, los principios de esta guía son lo suficientemente flexibles para poder aplicarse a especies relacionadas no mencionadas en este grupo (por ej., ganado vacuno vs. rumiantes en general, pollos vs. aves de corral en general).

En esta guía no se incluyen consideraciones para productos de acuicultura ni apicultura.

Los estudios deben realizarse de acuerdo con los principios aplicables de las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) y Buenas Prácticas Clínicas (BPC).

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

3. Glosario

Canasta alimenticia estándar: Es una estimación de la cantidad total de alimento de origen animal que es consumida diariamente por un adulto de 60 kg. La canasta alimenticia básica usa cifras arbitrarias de consumo que se basan en los percentiles superiores de la ingesta diaria de alimentos de origen animal.

Las cifras de consumo diario de alimentos de origen animal son:

Para mamíferos:

300 g de músculo, 50 g de grasa o grasa y piel, 100 g de hígado y 50 g de riñón.

Para aves:

300 g de músculo, 90 g de grasa y piel, 100 g de hígado y 10 g de riñón.

Para peces:

300 g de músculo y piel en proporciones naturales

Se consideran además un consumo de 1,5 l de leche, 100 g de huevos y 20 g de miel.

La estimación del riesgo del consumo de residuos presentes en una canasta alimenticia, se realiza teniendo en cuenta la IDA.

Principio activo – Agente Farmacológico (del inglés API: Active Pharmacological Ingredient) – Sustancia Farmacológicamente Activa: Es toda sustancia que puede utilizarse para la curación, mitigación, tratamiento, prevención o diagnóstico de las enfermedades del hombre o de los animales.

Ingesta Diaria Admisible (IDA): Es la estimación del residuo, expresado en términos de unidades de peso por kilogramo de peso vivo (kg/pv), que puede ser ingerida diariamente durante toda la vida, sin riesgo apreciable para la salud del consumidor.

Intervalo de confianza: Valores entre los cuales se espera hallar con cierto grado de certeza el valor de un parámetro poblacional.

Límite Máximo de Residuo (LMR): Es la concentración máxima de residuos presente en los productos y subproductos pecuarios que no implican riesgo para la salud del consumidor, sobre la base de hechos conocidos hasta su recomendación. (Definición CAMEVET)

Límite de cuantificación (LOQ): Es la menor concentración de un analito, cuya presencia se puede determinar con un grado específico de exactitud y precisión, dentro de límites estadísticos establecidos.

Límite de detección (LOD): Es la menor concentración de un analito que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse en una muestra dentro de límites estadísticos establecidos.

Límites de tolerancia: Son los valores extremos de una serie de valores (intervalo) entre los cuales se espera hallar con cierto grado de certeza un determinado porcentaje de los individuos de una población determinada.

Medicamento veterinario: toda sustancia química, biológica, biotecnológica o preparación manufacturada (elaborada) que se administra de forma individual o colectiva, directa o mezclada con los alimentos, destinada a la prevención, cura o tratamiento de las enfermedades de los animales.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina

Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165

E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Carencia – Período de Resguardo – Restricción de Uso – Período de Retiro – Período de Supresión: Período de tiempo mínimo que debe transcurrir entre la última aplicación de un medicamento veterinario a un animal, en las condiciones normales de empleo, y la obtención de productos alimenticios de dicho animal, para garantizar que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites máximos establecidos.

Producto Veterinario (definido según CAMEVET): Se entiende por producto veterinario a toda sustancia química, biológica, biotecnológica o preparación manufacturada cuya administración sea individual o colectiva directamente suministrado o mezclado con los alimentos o agua de bebida, con destino a la prevención, diagnóstico, curación o tratamiento de las enfermedades de los animales incluyendo en ello a aditivos, suplementos, promotores, mejoradores de la producción animal, antisépticos, desinfectantes de uso ambiental o en equipamientos y ectoparasiticidas y todo otro producto que, utilizado en los animales y su hábitat, proteja, restaure o modifique sus funciones orgánicas y biológicas. Comprende además los productos destinados al embellecimiento de los animales.

Residuo marcador: Es un analito que es confiable para determinar la presencia de residuos de un determinado principio activo en un tejido. El residuo marcador, puede ser la molécula madre o cualquiera de sus metabolitos, productos de degradación o una combinación de cualquiera de estos. El marcador también puede ser un derivado químico de uno o varios de los componentes del residuo. La relación entre el residuo marcador y la concentración de los residuos de interés en los tejidos comestibles debe ser conocida (residuo marcador/residuos de interés). El LMR refleja entonces la mayor concentración permitida del residuo marcador en los tejidos comestibles.

Residuo total: Consiste en la fracción del medicamento original conjuntamente con todos los metabolitos y productos provenientes de este medicamento, que permanecen en el alimento después que el medicamento haya sido suministrado a los animales productores de alimentos.

El total de residuos normalmente incluye todos los residuos relacionados al agente farmacológico (molécula madre junto con sus metabolitos), y en la mayoría de los casos es idéntica a la totalidad de residuos determinada por estudios de eliminación tisular radiométricos.

Residuos de importancia toxicológica: Para la estimación de una exposición basada en una IDA toxicológica, el residuo de interés es el residuo de importancia toxicológica. Este incluye normalmente todos los compuestos relacionados con la molécula (molécula madre con los metabolitos) y en la mayoría de los casos es idéntica a la totalidad de residuos determinada por estudios de depleción tisular radiométricos. Sin embargo, si se demuestra que un componente del residuo o una fracción de la totalidad de los residuos es toxicológicamente inactiva, es posible descontar ésta del residuo total o cualquier otra fracción de residuos que no sea biodisponible por vía oral o de metabolitos de los que se sabe que son toxicológicamente inactivos.

Residuos de interés farmacológico: Para la estimación de una exposición basada en una IDA farmacológica, el residuo de interés es el residuo de importancia farmacológica. Normalmente se considera a la molécula madre más cualquier otro residuo de la misma. En ausencia de datos sobre actividad farmacológica de los componentes del residuo total, se asume que el total de residuos presentan la misma actividad farmacológica que la molécula madre.

Residuos de interés microbiológico: Para la estimación de una exposición basada en una IDA microbiológica, el residuo de interés es el que tiene importancia microbiológica. En la mayoría de los casos este es idéntico a los residuos que se determinan en ensayos microbiológicos. En ausencia de tales datos, puede ser usado el residuo total o alternativamente la suma de los

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

componentes individuales de los que se conoce que presentan actividad microbiológica. Por lo tanto, se asume que la actividad microbiológica del residuo total o de los metabolitos y/o productos de degradación es igual a la molécula madre.

Sitio de inyección: Es un área de tejido en donde el medicamento veterinario ha sido inyectado. Las muestras de tejido obtenidas de los sitios de inyección para la realización de estudios de residuos, deben ser representativas de lo que con probabilidad puede ser seleccionado como tejido comestible en los procedimientos de faena. La muestra de tejidos deberá incluir tejido muscular, tejido conectivo y grasa subcutánea en proporciones naturales (el recorte de las muestras para eliminar el tejido conectivo y la grasa adherida al músculo se consideran procedimientos artificiales que se alejan de la situación real). Los sitios de inyección no deben incluir la porción de piel que recubre al mismo, dado que esta no es requerida para el análisis de los residuos.

Tejido: Todo tejido animal comestible, inclusive músculos y subproductos (Definiciones establecidas y adoptadas por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios - JECFA).

4. Estudios de eliminación del residuo marcador

4.1. Medicamento Veterinario en evaluación

El medicamento veterinario en evaluación utilizado debe ser representativo de la formulación comercial. Preferentemente, debe proceder del material elaborado con el uso de buenas prácticas de manufactura (GMP) (a escala piloto o a escala comercial); sin embargo, las preparaciones a escala de laboratorio debidamente documentadas también son aceptables.

4.2. Animales y cría de animales

En general, se puede realizar un solo estudio de eliminación del residuo marcador (en tejidos) en porcinos, equinos y en aves de corral. En el caso de los rumiantes, se puede aplicar un solo estudio para animales productores de carne y leche. Sin embargo, debido a las diferencias en la fisiología de rumiantes y pre-rumiantes, se recomiendan estudios separados cuando las especies blanco abarcan tanto a adultos como a pre-rumiantes. Se debe llevar a cabo un estudio separado para demostrar el perfil de eliminación de residuos en la leche de animales lecheros o en los huevos producidos por gallinas.

Los animales deben estar sanos y, preferentemente, no deben haber recibido medicamentos antes. Sin embargo, se puede permitir que los animales reciban vacunas y que hayan sido tratados anteriormente con, por ejemplo, antihelmínticos. En ese último caso, se debe observar un período de reposo farmacológico (*wash-out time*), adecuado a la terapia utilizada en el animal antes de que inicie el ensayo actual. Los animales en evaluación deben ser representativos de las razas comerciales y de la población animal blanco que será tratada. La procedencia, el peso, el estado de salud, la edad y el sexo del animal deben informarse.

Se debe dar a los animales el tiempo suficiente para acostumbrarse a las condiciones experimentales, y se deben aplicar, buenas prácticas clínicas. Los alimentos y el agua suministrados a los animales deben estar libres de otros fármacos y/o contaminantes y las condiciones ambientales adecuadas deben estar garantizadas, de acuerdo con las prácticas de bienestar animal.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

4.2.1. Estudios intramamarios

Para los estudios con medicamentos veterinarios que se aplican por vía intramamaria, todos los animales deben tener ubres sanas, libres de los efectos de mastitis. Para los estudios de medicamentos que se usan en terapias de secado o parto, los animales preñados con fecha de parición prevista deben ingresar en las instalaciones donde se llevará a cabo el estudio antes de que éste comience.

4.2.2. Otros parámetros

En la planificación y realización de los ensayos se deben tener en cuenta todos los factores que puedan contribuir a la variabilidad de los niveles de residuos en los productos de origen animal. La intención es que esos factores (por ej., las razas animales, la madurez física) se consideren sin necesidad de incrementar el número de animales recomendado en 4.3. Por ejemplo, si un estudio de eliminación de residuos en leche recomienda 20 animales, todo factor que determine variabilidad debe estar representado en los 20 animales seleccionados inicialmente (no se agregarán 20 animales más que representen “otros factores”).

4.3. Número de animales para el estudio

La cantidad de animales empleados debe ser lo suficientemente numerosa para permitir una evaluación estadísticamente significativa de los datos. Desde un punto de vista estadístico, se recomienda, para estudios de residuos en carne, reunir datos de un mínimo de 16 animales: 4 animales sacrificados en 4 intervalos de tiempo apropiadamente distribuidos. Se puede considerar un número mayor de animales si se anticipa que la variabilidad biológica será sustancial, ya que el incremento en la cantidad puede contribuir a determinar con mayor precisión el período de retiro. No se requieren necesariamente animales control (no tratados) como parte del estudio de eliminación del residuo marcador; sin embargo, se debe disponer de una cantidad suficiente de tejidos blanco para la preparación de patrones en la evaluación de métodos analíticos relacionados. La siguiente sección da recomendaciones generales sobre el número de animales que se deben incluir en el diseño del estudio.

4.3.1. Rumiantes, porcinos y equinos para estudios de residuos en tejidos

Se recomiendan por lo menos 4 (aproximadamente la mitad de cada sexo) para cada tiempo de faena. El peso corporal debe ser acorde a la categoría para la cual está indicado el medicamento veterinario. Según lo expuesto en la sección 4.2, las vacas lecheras también pueden ser utilizadas para estos estudios de residuos en tejidos.

4.3.2. Animales lecheros para estudios de residuos en leche

Para los estudios con animales en lactación, se recomienda el empleo de, por lo menos, 20 animales, seleccionados al azar de un rodeo en el que todas las etapas de la lactación estén representadas. Se deben incluir animales con alta producción al inicio de la lactancia y animales con baja producción al final de la lactancia.

Para los estudios de secado y terapia parto se recomienda un mínimo de 20 animales. El estudio debe incluir vacas seleccionadas al azar, representativas de las prácticas lecheras comerciales.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

4.3.3. Aves de corral

Se debe utilizar un número suficiente de aves para obtener, por lo menos, 6 muestras en cada tiempo de faena para los estudios de residuos en tejidos.

Para los estudios de residuos en huevos, se debe emplear un número suficiente de aves para recolectar, al menos, 10 o más huevos en cada punto del intervalo de tiempo.

4.4. Vía de Administración

4.4.1. Guía general

El tratamiento de animales debe realizarse de acuerdo con la dosis y las indicaciones que se le desea asignar al medicamento veterinario en proceso de aprobación y debe incluir, en los productos inyectables, el sitio y el método de inyección. En los tratamientos múltiples, las inyecciones deben aplicarse alternativamente en el lado izquierdo y derecho del animal.

La dosis debe ser la máxima concentración prevista de tratamiento y debe administrarse durante la máxima duración prevista. Para tratamientos prolongados que incluyen varias dosificaciones, si se dispone de datos que indiquen que la concentración del principio activo (API) alcanza un estado estacionario (momento en el cual la concentración del principio activo en el tejido blanco no aumenta ni disminuye, porque su velocidad de absorción es igual a su velocidad de eliminación) antes del final del tratamiento, el muestreo puede comenzar a partir de ese momento. Los medicamentos veterinarios de administración intramamaria deben aplicarse en los cuatro cuartos de cada vaca.

Para los estudios de secado y parto el medicamento veterinario en evaluación debe administrarse luego del último ordeño (secado) y respetando el intervalo hasta el nacimiento del ternero (usualmente 60 días).

4.4.2. Consideraciones para medicamentos veterinarios elaborados para múltiples vías de administración

Si el medicamento veterinario fue elaborado para ser administrado a través de más de una vía parenteral inyectable (intramuscular, subcutánea o intravenosa), se debe presentar un estudio de eliminación del residuo marcador por separado para cada vía. *[Nota: Si el período de retiro se define claramente por la eliminación de residuos del sitio de inyección luego de la dosis SC (subcutánea) o IM (intramuscular), no sería necesario presentar un estudio por separado de residuos intravenosos (a la misma dosis), siempre y cuando se pueda aplicar para la vía IV el mismo período de retiro que se aplicó para la vía IM o SC].*

4.4.3. Recomendaciones para la aplicación de un medicamento veterinario por aspersión:

Los productos que se aplican por aspersión son ampliamente utilizados en muchos de los países miembros para el tratamiento de ectoparásitos. La estandarización de la dosificación es un requisito crítico y debe realizarse previamente a un estudio de residuos. Con este fin se recomienda el siguiente esquema:

- a- Se deberá cargar el equipo de aspersión con una cantidad previamente medida del medicamento veterinario preparado y listo para su aplicación
- b- Luego de cargada la mochila o equipo de aspersión se deberá purgar el sistema.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

- c- Comenzar la aspersión por la parte dorsal del animal y desde la cabeza hacia la cola para luego volver nuevamente hacia craneal por la zona baja contigua, describiendo de esta manera un recorrido que asegure un correcto mojado del animal. Esto se deberá realizar en ambos lados del animal hasta el punto de goteo y siempre evitando aplicar producto en los ojos del animal. El punto de goteo es un indicador de que el animal ha sido correctamente mojado, y que a partir de ahí todo el producto que se aplique no quedara sobre el animal y por lo tanto escurrirá hacia al piso. Este es el parámetro que normalmente se utiliza para tratar animales en condiciones de campo, y uno de los más apropiados para acotar las variables de dosificación que este tipo de aplicaciones tiene.
- d- De ser factible una vez finalizada la aplicación se deberá recolectar en un vaso graduado el producto remanente del equipo de aspersión para calcular el volumen aplicado. Este dato, deberá ser registrado en el “registro de tratamiento” .

$$\text{Volumen cargado} - \text{Volumen remanente} = \text{Volumen aplicado}$$

Volumen aplicado se deberá correlacionar con el peso del animal para conocer de forma certera la dosis aplicada por animal en términos de miligramos totales y miligramos por kilogramo.

4.5. Sacrificio animal

Los animales deben sacrificarse siguiendo las normativas de bienestar animal recomendadas por la OIE, empleando de ser posible procedimientos aplicables comercialmente, asegurándose de cumplir con los tiempos de desangrado establecidos. Se debe evitar la muerte con productos químicos.

4.6. Muestreo

4.6.1. Consideraciones Generales

Luego del sacrificio, se deben recolectar suficientes muestras de tejido comestible, recortar el tejido superfluo, pesar y dividir en porciones. Si el análisis no puede completarse inmediatamente, las muestras deben almacenarse adecuadamente a la espera del análisis. Si las muestras se almacenan luego de la recolección, se debe demostrar la estabilidad del residuo durante el tiempo de evaluación.

La Tabla 1 indica las muestras que se recomienda sean recolectadas en el sacrificio.

Tabla 1. Recolección de muestras de animales en un estudio de eliminación del residuo marcador (Todas las regiones)

Tipo de tejido comestible	Descripción de la muestra por especie	
	Bovinos / Ovinos / Porcinos / Equinos	Aves de corral
Músculo	Músculo de la región lumbar	Pechuga

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Sitio de inyección	Centro de tejido muscular ~0,5 kg. 10 cm diámetro x 6 cm de profundidad para IM; 15 cm diámetro x 2,5 cm de profundidad para SC	---
Hígado	Sección transversal de lóbulos	Entero
Riñón	Compuesta de ambos riñones	Compuesta de ambos riñones
Grasa (excluyendo porcinos)	Omental y/o perirrenal	---
Piel (porcinos y aves)	Piel con grasa en proporciones naturales	Músculo con piel en proporciones naturales
Leche (ovinos y bovinos)	Leche entera	---
Huevos	---	Limpiar la cáscara, romper el huevo, la clara y la yema se pueden combinar

Los tejidos que se muestran en la Tabla 1 se deben analizar para el registro en todas las regiones. Sin embargo, la guía del VICH para llevar a cabo “Estudios de metabolismo para determinar la cantidad e identificar la naturaleza de los residuos” recomienda la recolección de tejidos adicionales para cuantificar los residuos totales a fin de responder a las preocupaciones regionales específicas. Los tejidos adicionales sugeridos para las muestras se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Tejidos adicionales que se deben recolectar para responder a las preocupaciones regionales en el estudio de eliminación del residuo marcador.

Tipo de tejido comestible	Descripción de las muestra por especie		
	Bovinos / Ovinos / Porcinos / Equinos	Aves de corral	
Estómago muscular	---	Entero	

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Corazón	Sección transversal	Entero	
Intestino Delgado	Compuesto, enjuagado de contenido	---	
Otros órganos	Compuesto	Compuesto	

En caso de considerarse necesario, a los fines de esta guía, se seleccionará uno de los tejidos adicionales (por especie) para evaluar el residuo marcador y responder a las preocupaciones regionales. El tejido adicional elegido se basa en los resultados del estudio de residuo total (TTR, por su sigla en inglés) y típicamente es el tejido adicional con mayor concentración de residuos o con la menor tasa de eliminación de residuos. Por ejemplo, si el estudio TTR indica que el corazón de los bovinos tiene la tasa de eliminación más baja, ese tejido adicional será seleccionado para la evaluación en el estudio del residuo marcador, pero no hará falta generar datos sobre el residuo marcador del intestino delgado. De igual modo, si el estómago muscular de las aves de corral contienen la mayor concentración de residuos, no se recomienda el análisis del corazón de las aves.

4.6.2. Sitios de inyección

Para preparaciones parenterales (IM o SC), se deben incluir los datos sobre la eliminación de residuos del sitio (o los sitios) de inyección. Las muestras se deben recolectar del último sitio de inyección. En el caso de productos que requieren múltiples inyecciones, el estudio debe estar diseñado de modo tal que el último sitio de inyección sea del lado en el que el animal recibió el mayor número de inyecciones. Se recomienda mantener una distancia mínima de 10 centímetros entre sitios de inyección con el propósito de obtener una mejor calidad de muestra. La extracción de muestras del tejido muscular del sitio de inyección (de los animales grandes) debe centrarse en el punto de inyección y de acuerdo con las recomendaciones de la Tabla 1.

Durante la realización del estudio de residuos, el sitio de inyección deberá estar permanentemente marcado, de manera que éste pueda ser fácil y correctamente identificado al momento del sacrificio. El medicamento veterinario deberá ser administrado en el centro del tejido subyacente y el sitio de inyección deberá ser extraído inmediatamente luego del sacrificio.

La técnica de recolección debe ser tal que incluya, cuando sea posible: el trayecto de la aguja, el área en la que se liberó el fármaco y cualquier área en la que haya reacción tisular.

Con el objeto de asegurar que el método de muestreo descrito ha sido adecuado para representar la concentración de residuos, se recomienda cuando sea posible, tomar de cada sitio de inyección una muestra control de aproximadamente 300 g en forma de anillo concéntrico a la muestra primaria.

La recolección de un círculo adicional o una muestra del lugar que rodea el sitio de inyección durante la realización de estudios de eliminación de residuos tisulares se requieren en la UE, pero generalmente no en otras regiones.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Se reconoce que no siempre es posible obtener esta segunda muestra, particularmente en las inyecciones realizadas en la región del cuello, por lo tanto el tamaño de la muestra de tejido de la región periférica a la muestra primaria puede reducirse tanto como sea posible. Es necesario sin embargo, que esta muestra presente un tamaño que permita su procesamiento analítico.

En los productos inyectables donde la dosis aplicada supere el volumen recomendado por sitio de aplicación, la inyección se deberá realizar en más de un sitio (ej: Dosis IM o SC de 1 mL/10 kg para un animal de 360 Kg donde el volumen máximo recomendado es de 20 mL). En estos casos la muestra de sitio de inyección se deberá realizar del sitio inyectado que recibió el mayor volumen (el sitio donde se inyectó 20 mL y no el del segundo sitio con 16 mL).

En la práctica, la obtención de muestras con el peso exacto al propuesto es difícil de realizar, por lo tanto se acepta que el peso real puede variar dentro de ciertos límites respecto del peso teórico propuesto. Se considera que son aceptables las muestras del centro del sitio de inyección (muestra primaria) que presenten un peso que fluctúe entre 400 g a 600 g ($500 \text{ g} \pm 20\%$).

Seguidamente a la remoción del tejido, las muestras del sitio de inyección colectadas (centro y periferia) deberán ser apropiadamente homogeneizadas antes de realizar el muestreo final (300 g) para la determinación de los residuos, y así evitar el procesamiento analítico de un material potencialmente no homogéneo.

Las dimensiones y los pesos de las muestras de los tejidos en el sitio de inyección propuestas no pueden ser aplicadas en animales de pequeña talla, en donde el tamaño y la anatomía de los mismos no permiten tomar una muestra de 500 g.

Aquí no puede aplicarse una estrategia general, sino que esta debe ser diseñada caso por caso y la técnica de muestreo elegida y el peso del tejido a analizar deberán ser convenientemente justificados. En este caso, también deberá en la medida de lo posible, tomarse una muestra de tejido periférico al sitio de inyección para corroborar la confiabilidad del método analítico utilizado.

Deberá tenerse en cuenta que la concentración de residuos determinada a partir de muestras obtenidas en animales de pequeña talla o muestras de tejido con un peso y tamaño menor al propuesto en esta guía, deberán ser usadas sin ningún tipo de corrección o dilución para el cálculo del tiempo de retiro.

4.6.3. Otras consideraciones

- Para las formulaciones que pueden dejar residuos locales, como los medicamentos veterinarios de aplicación tópica por derrame (pour on), se deben recoger muestras de tejidos relevantes (por ej., músculos, grasa subcutánea o piel/grasa del lugar de aplicación) para el análisis (además de las muestras especificadas en la Tabla 1).
- Para mayor claridad, si uno o más tejidos se analiza como tejido compuesto, como piel más grasa en proporciones naturales (porcinos y aves), no hace falta analizar muestras de piel y grasa por separado.
- Las muestras de músculos se pueden obtener de los músculos esqueléticos que incluyan grasa intramuscular en proporciones naturales.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

- Se recomienda recoger sólo un tipo de muestra de grasa (omental para rumiantes y equinos) o de piel con grasa (porcinos y aves de corral).

4.6.4. Muestreo de leche

Las muestras de leche se deben extraer de todos los animales incluidos en el ensayo. La extracción debe realizarse en cada ordeño, espaciados por intervalos iguales (aproximadamente 12 hs.). Las muestras de cada animal estarán compuestas por leche de los cuatro cuartos. Cuando el tratamiento esté compuesto por varias dosificaciones, las muestras se deben tomar luego de la última dosificación, excepto cuando pueden calificar para períodos de retiro de 0 días, en cuyo caso las muestras también se deben recoger durante el tratamiento. No existe un número estándar de tiempos de muestreo. La recolección de leche debe continuar hasta que los residuos estén por debajo del punto de referencia apropiado (por ej., LMR, tolerancia, límite de cuantificación, etc.) según se determina en las propiedades químicas del principio activo.

Si bien se encuentra fuera del alcance de esta guía, al patrocinador del estudio se le puede solicitar que realice el estudio de residuos en los tejidos de los terneros que se alimentaron de leche (incluido el calostro) de los animales adultos tratados (por ej., las madres), si esos animales serán destinados al consumo humano.

4.6.5. Muestreo de huevos

Las muestras de huevos se deben obtener de 10 o más gallinas ponedoras en cada momento en que ponen huevos durante el período de medicación y luego de la última medicación. Las muestras deben recogerse luego del tiempo necesario para que se complete el desarrollo de la yema del huevo, que es de 12 días. La clara y la yema del huevo se pueden combinar para el análisis.

5. Recomendaciones para los medicamentos veterinarios propuestos para períodos de retiro de 0 días (Estudios de un solo punto temporal)

Para los medicamentos veterinarios administrados en una o varias dosificaciones (por ej. diariamente de 3 a 5 días) o para aquellos de uso continuo en los que los residuos han alcanzado un estado estacionario, un estudio de un solo punto temporal es suficiente para determinar el período de retiro de 0 días, siempre y cuando las características de eliminación de residuos totales del fármaco hayan sido descritas adecuadamente. Si esos datos están disponibles, se recomienda la realización de un estudio de un solo punto temporal con el menor número especificado de animales para confirmar la aceptabilidad del período de retiro de 0 días.

- Aves de corral: 12 aves
- Rumiantes, equinos y porcinos: 6 animales
- Leche: 10 animales

El momento elegido para el sacrificio para este estudio debe determinarse de acuerdo con las concentraciones máximas observadas durante el estudio de eliminación de residuos totales, un tiempo de transporte mínimo (por ej., no menor de 3 hs.) y un tiempo máximo que siga calificando para tiempo de retiro de 0 días (por ej., ≤ 12 hr).

El número incrementado en comparación con el recomendado en la Sección 4.3 se justifica para un solo punto temporal. Sin embargo, para hembras en producción de leche para consumo o

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

industrialización, se recomienda un mínimo de 10 animales, ya que esa cantidad es suficiente para definir la concentración de leche en un solo punto temporal (0 días). Las concentraciones del principio activo que se mantienen por debajo del punto de referencia apropiado (por ej, LMR, tolerancia) se considerarán para el establecimiento de un tiempo de retiro de 0 días.

Mientras que el establecimiento de un tiempo de retiro de 0 días es posible, basándose en un protocolo de muestra de un sólo punto de muestreo (por ej. 12 horas), se recomienda que se recolecten muestras adicionales (por ej. 1-4 ordeños) para una evaluación exhaustiva del perfil de residuos, en caso de no contar con dicha información. Dado que los estudios de leche no requieren el sacrificio final para la recolección de muestras, esta recomendación debe seguirse sin excepciones.

En el caso de gallinas en producción de huevos, podrá establecerse un tiempo de retiro de cero días a partir de la obtención de muestras consecutivas por debajo del punto de referencia (Límite Máximo de Residuos o tolerancia) durante los 12 días de la etapa de recolección de huevos para su análisis, dadas las condiciones fisiológicas del proceso de ovogénesis.

6. Estudios de comprobación de periodo de retiro.

La prueba en un único punto de comprobación, es una prueba especial que tiene validez técnica pero circunscrita a la comparación de los resultados de la eliminación de residuos con un medicamento veterinario ampliamente conocido y utilizado en la práctica veterinaria y del cual han sido previamente registradas formulaciones semejantes en el país donde se presenta. En este estudio se utilizan menos animales y el resultado solo indica si puede aplicarse la misma restricción de uso o no. Esta prueba hace sólo una cosa: indica si los residuos están iguales o por debajo del LMR permitido en el punto (en el tiempo) que se ha seleccionado para la prueba. Prácticamente no calcula el periodo de retiro, pero si confirma un periodo específico de retiro comparado con el del medicamento veterinario ya conocido.

6.1. Criterios para determinar la necesidad de un estudio de residuos o de un estudio de comprobación de periodo de retiro

Cada autoridad regulatoria definirá los criterios que determinarán la posibilidad de recurrir a un estudio de comprobación de período de retiro dependiendo del tipo de producto (genérico o similar) de que se trate y del(los) principio(s) activo(s) presente(s).

6.2. Interpretación de los resultados del estudio de comprobación de periodo de retiro

- Si el estudio demuestra que los residuos del medicamento veterinario sometido a ensayo están por debajo del LMR, la comprobación es aceptada.
- Si el estudio demuestra lo contrario, es decir, que los residuos están por encima del LMR entonces la prueba no se acepta, y no se puede utilizar el periodo establecido por el producto de referencia, y debe realizarse un estudio completo de eliminación de residuos.

6.3. Diseño experimental

Se debe detallar la especie, edad, raza, línea genéticas, sexo y origen de los animales utilizados. La prueba deberá realizarse con el número mínimo de animales que se detalla en la tabla que sigue:

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Especie animal/producto	Estado productivo	Número mínimo
Rumiantes/porcinos/equinos	Cualquier	6
Vacas lecheras	Lactación/secado/pre-parto	10
Aves	Cualquier	10
Conejos/cuyes	Cualquier	10
Huevos	---	12

El ensayo deberá cumplir con las indicaciones que constan en los puntos 4.2; 4.4; 4.5 de la presente guía. Para el muestreo (punto 4.6.) solamente será necesario procesar muestras del tejido blanco, entendiéndose por tejido blanco aquél que en estudios previos ha sido el que se utilizó para determinar el período de restricción de uso.

7. Método analítico para ensayos de residuos marcadores

El patrocinador del estudio se responsabiliza por la presentación de métodos analíticos validados para la determinación del residuo marcador en muestras generadas en los estudios de eliminación de residuos en los tejidos comestibles y, cuando fuera necesario, en leche, huevos y miel. El/Los método(s) deben ser capaces de determinar con fiabilidad las concentraciones del residuo marcador que abarca el punto de referencia apropiado (eso es, LMR /tolerancia) para los respectivos tejidos o productos. (Ver: Guía de Recomendaciones para Validación de Métodos Analíticos).

Fecha de vigencia

Periodicidad de revisión

5 años

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

ANEXO II.ii

Abril 2011
Revisión: Mayo 2013

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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Tabla de contenidos

1. Introducción	3
1.1 Objetivo de la guía	3
1.2 Antecedentes	3
2. Alcance.....	3
3. Glosario	4
4. Parámetros a tener en cuenta para la validación del método analítico	5
4.1. Linealidad.....	5
4.2. Exactitud	6
4.3. Presición.....	7
4.4. Límite de detección	7
4.5. Límite de cuantificación	7
4.6. Selectividad	8
4.7. Estabilidad en la matriz	8
4.8. Estabilidad en la muestra procesada	8
4.9. Robustez	9
Anexo 1	10
Anexo 2	11
Anexo 3	12
Anexo 4	20

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. 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 prescriptas 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.

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”.

4. 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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina

Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165

E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

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.

4.1. 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 4.3 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.

4.2. 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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina

Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165

E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

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

4.3. 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%
≥ 10 µg/kg < 100 µg/kg	20%
≥ 100 µg/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:

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

4.4. 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.

4.5. 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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

exactitud, la precisión, el LOD, el LOQ y la selectividad en un único estudio.

4.6. 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.

4.7. 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.

4.8. 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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

inicial o de la valoración de la muestra control recién fortificada y procesada.

4.9. 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.

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/Medicación 1	Día/Medicación 2	Día/Medicación 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

* 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.

† cada fuente se selecciona aleatoriamente de modo que cada fuente quede representada al

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

menos una vez en cada concentración en las 3 mediciones de validación.

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 .

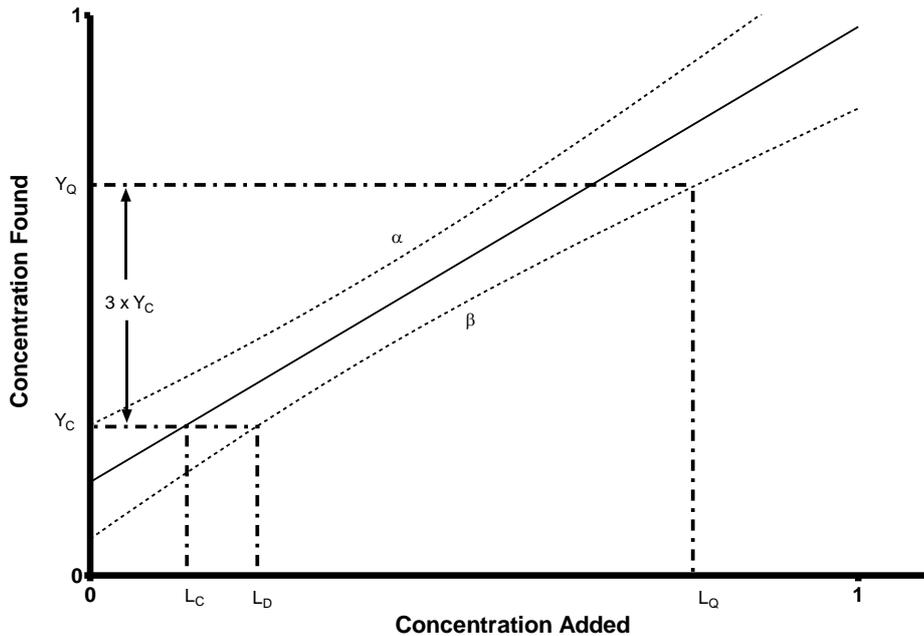
6. Establecer un límite de determinación (Y_Q) multiplicando el límite de detección (Y_C) por 3 (la relación aceptada comúnmente entre el LOD y el LOQ es 3). El LOQ (L_Q) puede determinarse calculando el punto en el que la línea Y_Q cruza el límite inferior de confianza β que reduce la tasa de falso 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.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina

Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165

E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>



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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

	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				7,6	101,8	7,4
	50						
	150	7,5	109,1	6,8			
	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:

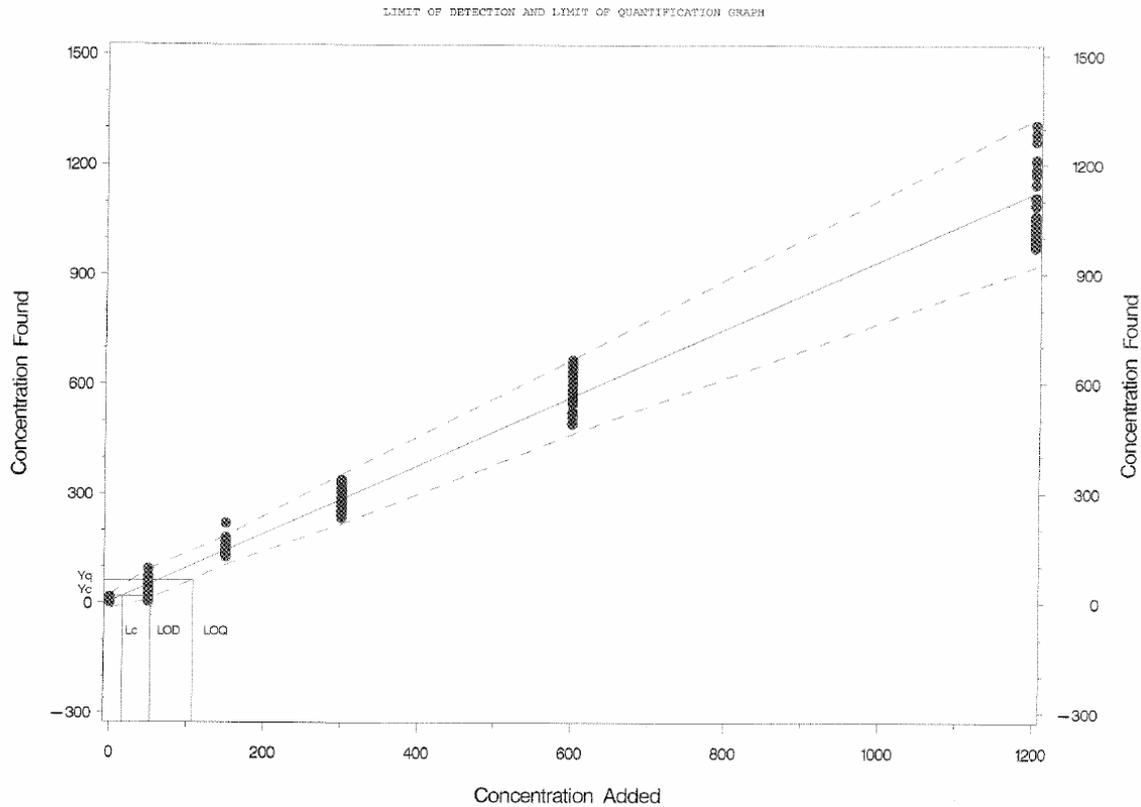
LOD = 62 ng/ml

LOQ = 112 ng/ml

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

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>



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.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

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:

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

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

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.

ANEXO II.iii

Mayo 2011
Revisión: Mayo 2013
Segunda revisión: Diciembre 2013

GUÍA PARA EL CÁLCULO DEL PERÍODO DE RETIRO EN TEJIDOS COMESTIBLES

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Tabla de Contenidos

Prólogo	4
1. Introducción	6
2. Glosario	6
3. Alcance de la guía	9
4. Estimación del período de retiro	9
4.1. Modelo estadístico	9
4.1.1. Base de datos	10
4.1.2. Supuestos del análisis de regresión lineal	11
4.1.2.1. Homogeneidad de varianzas (homocedasticidad)	11
4.1.2.2. Linealidad del \ln de los datos experimentales	11
4.1.2.3. Normalidad de los errores	11
4.1.3. Procedimiento estadístico basado en el LMR	12
4.1.4. Procedimiento alternativo basado en el LMR	13
4.2. Tiempo de retiro estimado a partir de los residuos en el sitio de inyección	13
4.2.1. Interpretación	14
4.2.2. Principios generales	14
4.2.3. Diseño del estudio y toma de muestras	14
4.2.4. Procedimiento basado en el LMR	15
4.2.5. Procedimiento basado en la IDA	15
4.2.6. Procedimiento basado en el límite de exposición alternativo	17
5. Referencias	21
6. Anexo	22

1. Introducción

La seguridad del consumidor necesita ser resguardada mediante la valoración de todas las sustancias farmacológicamente activas destinadas a ser usadas en animales productores de alimentos. Los períodos de retiro son determinados con el objeto de asegurar que los residuos de dichas sustancias en los tejidos comestibles disminuyan hasta concentraciones permitidas.

Mientras que el límite máximo de residuos (LMR) para un determinado tejido se aplica para el principio activo en sí mismo, el período de retiro se fija de manera individual para cada medicamento veterinario como parte del proceso de autorización de comercialización.

El principio activo incluido en el medicamento veterinario que se administra a los animales productores de alimentos no necesariamente es la sustancia que estará presente en los productos comestibles. Los sistemas enzimáticos o fluidos fisiológicos de un animal, pueden actuar sobre dicho principio activo administrado y producir nuevas sustancias tales como metabolitos que pueden ser tanto o más nocivos para el consumidor que el principio activo original. La concentración de estas sustancias en los productos comestibles de origen animal estará en función de la velocidad y el grado de absorción del agente farmacológico original, la velocidad del metabolismo y la tasa de excreción tanto del principio activo original como de sus metabolitos. Por lo tanto, el residuo total del agente farmacológico administrado en los animales tratados se compondrá del principio activo original, metabolitos libres y metabolitos que están unidos a moléculas endógenas.

Debido a que los diferentes componentes de los residuos totales pueden diferir en sus potenciales toxicológicos, es que se debe proporcionar información sobre la naturaleza química, la cantidad y la persistencia de los residuos totales en los tejidos comestibles de los animales que han sido objeto del tratamiento.

La forma más simple y práctica de determinar el período de retiro ha sido la de identificar el momento en que en todos los tejidos monitoreados de todos los animales experimentales, las concentraciones se ubican por debajo del LMR. En algunos casos y, cuando hay una variabilidad marcada entre los datos de eliminación, se suele agregar un período de tiempo como factor de seguridad.

En algunos casos, se han utilizado métodos estadísticos que, de ser aceptados en forma generalizada generarían una gran oportunidad de armonización.

La elección del método estadístico a utilizar es responsabilidad del solicitante, en cualquier caso, deberá estar debidamente justificado con documentos adecuados.

En esta guía se describen los procedimientos estandarizados para poder establecer el período de retiro apropiado para cada principio activo asociado a una forma farmacéutica, dosis y vía de administración propuesta para una determinada especie animal, a fin de garantizar la seguridad del consumidor.

2. Glosario

Canasta alimenticia estándar: Es una estimación de la cantidad total de alimento de origen animal que es consumida diariamente por un adulto de 60 kg. La canasta alimenticia básica usa cifras arbitrarias de consumo que se basan en los percentiles superiores de la ingesta diaria de alimentos de origen animal.

Las cifras de consumo diario de alimentos de origen animal son:

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Para mamíferos:

300 g de músculo, 50 g de grasa o grasa y piel, 100 g de hígado y 50 g de riñón.

Para aves:

300 g de músculo, 90 g de grasa y piel, 100 g de hígado y 10 g de riñón.

Para peces:

300 g de músculo y piel en proporciones naturales

Se consideran además un consumo de 1,5 l de leche, 100 g de huevos y 20 g de miel.

La estimación del riesgo del consumo de residuos presentes en una canasta alimenticia, se realiza teniendo en cuenta la IDA.

Principio activo – Agente Farmacológico (del inglés API: Active Pharmaceutical Ingredient) – Sustancia Farmacológicamente Activa: Es toda sustancia que puede utilizarse para la curación, mitigación, tratamiento, prevención o diagnóstico de las enfermedades del hombre o de los animales.

Ingesta Diaria Admisible (IDA): Es la estimación del residuo, expresado en términos de unidades de peso por kilogramo de peso vivo (kg/pv), que puede ser ingerida diariamente durante toda la vida, sin riesgo apreciable para la salud del consumidor.

Intervalo de confianza: Valores entre los cuales se espera hallar con cierto grado de certeza el valor de un parámetro poblacional.

Límite Máximo de Residuo (LMR): Es la concentración máxima de residuos presente en los productos y subproductos pecuarios que no implican riesgo para la salud del consumidor, sobre la base de hechos conocidos hasta su recomendación. (Definición CAMEVET)

Límite de cuantificación (LOQ): Es la menor concentración de un analito, cuya presencia se puede determinar con un grado específico de exactitud y precisión, dentro de límites estadísticos establecidos.

Límite de detección (LOD): Es la menor concentración de un analito que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse en una muestra dentro de límites estadísticos establecidos.

Límites de tolerancia: Son los valores extremos de una serie de valores (intervalo) entre los cuales se espera hallar con cierto grado de certeza un determinado porcentaje de los individuos de una población determinada.

Medicamento veterinario: toda sustancia química, biológica, biotecnológica o preparación manufacturada (elaborada) que se administra de forma individual o colectiva, directa o mezclada con los alimentos, destinada a la prevención, cura o tratamiento de las enfermedades de los animales.

Carencia – Período de Resguardo – Restricción de Uso – Período de Retiro – Período de Supresión: Período de tiempo mínimo que debe transcurrir entre la última aplicación de un medicamento veterinario a un animal, en las condiciones normales de empleo, y la obtención de productos alimenticios de dicho animal, para garantizar que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites máximos establecidos.

Producto Veterinario (definido según CAMEVET): Se entiende por producto veterinario a toda sustancia química, biológica, biotecnológica o preparación manufacturada cuya administración

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

sea individual o colectiva directamente suministrado o mezclado con los alimentos o agua de bebida, con destino a la prevención, diagnóstico, curación o tratamiento de las enfermedades de los animales incluyendo en ello a aditivos, suplementos, promotores, mejoradores de la producción animal, antisépticos, desinfectantes de uso ambiental o en equipamientos y ectoparasiticidas y todo otro producto que, utilizado en los animales y su hábitat, proteja, restaure o modifique sus funciones orgánicas y biológicas. Comprende además los productos destinados al embellecimiento de los animales.

Residuo marcador: Es un analito que es confiable para determinar la presencia de residuos de un determinado principio activo en un tejido. El residuo marcador, puede ser la molécula madre o cualquiera de sus metabolitos, productos de degradación o una combinación de cualquiera de estos. El marcador también puede ser un derivado químico de uno o varios de los componentes del residuo. La relación entre el residuo marcador y la concentración de los residuos de interés en los tejidos comestibles debe ser conocida (residuo marcador/residuos de interés). El LMR refleja entonces la mayor concentración permitida del residuo marcador en los tejidos comestibles.

Residuo total: Consiste en la fracción del medicamento original conjuntamente con todos los metabolitos y productos provenientes de este medicamento, que permanecen en el alimento después que el medicamento haya sido suministrado a los animales productores de alimentos.

El total de residuos normalmente incluye todos los residuos relacionados al agente farmacológico (molécula madre junto con sus metabolitos), y en la mayoría de los casos es idéntica a la totalidad de residuos determinada por estudios de eliminación tisular radiométricos.

Residuos de importancia toxicológica: Para la estimación de una exposición basada en una IDA toxicológica, el residuo de interés es el residuo de importancia toxicológica. Este incluye normalmente todos los compuestos relacionados con la molécula (molécula madre con los metabolitos) y en la mayoría de los casos es idéntica a la totalidad de residuos determinada por estudios de depleción tisular radiométricos. Sin embargo, si se demuestra que un componente del residuo o una fracción de la totalidad de los residuos es toxicológicamente inactiva, es posible descontar ésta del residuo total o cualquier otra fracción de residuos que no sea biodisponible por vía oral o de metabolitos de los que se sabe que son toxicológicamente inactivos.

Residuos de interés farmacológico: Para la estimación de una exposición basada en una IDA farmacológica, el residuo de interés es el residuo de importancia farmacológica. Normalmente se considera a la molécula madre más cualquier otro residuo de la misma. En ausencia de datos sobre actividad farmacológica de los componentes del residuo total, se asume que el total de residuos presentan la misma actividad farmacológica que la molécula madre.

Residuos de interés microbiológico: Para la estimación de una exposición basada en una IDA microbiológica, el residuo de interés es el que tiene importancia microbiológica. En la mayoría de los casos este es idéntico a los residuos que se determinan en ensayos microbiológicos. En ausencia de tales datos, puede ser usado el residuo total o alternativamente la suma de los componentes individuales de los que se conoce que presentan actividad microbiológica. Por lo tanto, se asume que la actividad microbiológica del residuo total o de los metabolitos y/o productos de degradación es igual a la molécula madre.

Sitio de inyección: Es un área de tejido en donde el medicamento veterinario ha sido inyectado. Las muestras de tejido obtenidas de los sitios de inyección para la realización de estudios de residuos, deben ser representativas de lo que con probabilidad puede ser seleccionado como tejido comestible en los procedimientos de faena. La muestra de tejidos deberá incluir tejido muscular,

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

tejido conectivo y grasa subcutánea en proporciones naturales (el recorte de las muestras para eliminar el tejido conectivo y la grasa adherida al músculo se consideran procedimientos artificiales que se alejan de la situación real). Los sitios de inyección no deben incluir la porción de piel que recubre al mismo, dado que esta no es requerida para el análisis de los residuos.

Tejido: Todo tejido animal comestible, inclusive músculos y subproductos (Definiciones establecidas y adoptadas por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios - JECFA).

3. Alcance de la guía

Esta guía es una recomendación para el cálculo de períodos de retiro adecuados para tejidos comestibles provenientes de animales productores de alimentos cuando a estos se les aplica un medicamento veterinario (MV) determinado, en un intento de armonizar la metodología utilizada internacionalmente para esos fines. Esta guía también pone énfasis en la determinación del tiempo de retiro por el método estadístico basado en el límite máximo de residuos (LMR), el cual es considerado de primera elección.

La presente guía no tiene como alcance el cálculo de períodos de retiro en otros productos de origen animal como ser leche, huevos, miel y productos de acuicultura, los cuales requieren una consideración aparte.

Se describen los siguientes procedimientos:

- Procedimiento estadístico basado en el LMR
- Procedimiento alternativo basado en el LMR.
- Tiempo de retiro pre-faena estimado a partir de los residuos en el sitio de inyección (incluye método basado en el LMR, IDA y procedimiento basado en el límite de exposición alternativo).

Los estudios de residuos mencionados deben incluir la descripción y la validación de los métodos analíticos (ver Guía 2: “Guía para la Validación de Métodos Analíticos para la Determinación de Residuos en Matrices Biológicas”).

Para el diseño experimental de la fase animal se recomienda ver Guía 1 “Guía Técnica para la Conducción de Estudios de Metabolismo y Cinética de Residuos de Agentes farmacológicos de Uso Veterinario en Animales Productores de Alimentos”

4. Estimación del período de retiro

4.1. Modelo estadístico

El cálculo del período de retiro mediante el método estadístico, se basa en principios aceptados de farmacocinética básica. Tomando como base un modelo farmacocinético de un compartimiento, la relación entre la concentración de un principio activo y el tiempo durante las fases de absorción, distribución y eliminación, puede ser descripta por términos matemáticos multi-exponenciales. Sin embargo, la eliminación de dicha sustancia y/o sus metabolitos desde los tejidos, da lugar a una curva de concentraciones tisulares que sigue una declinación exponencial de orden uno, la que puede ser adecuadamente descrita por un modelo de un compartimiento con un solo término exponencial. La ecuación de primer orden aparente que describe la cinética de depleción tisular es la siguiente:

$$C_t = C_0 e^{-kt}$$

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

donde C_t es la concentración tisular a un tiempo dado, C_0 es la concentración de residuo a tiempo cero, e es la base de los logaritmos naturales, k es la constante de primer orden aparente de eliminación y t es el tiempo.

El término C_0 representa el punto de intersección en el eje de la ordenada a tiempo cero, el mismo es en realidad solo una concentración teórica necesaria para el ajuste de los datos experimentales con el modelo de un solo término exponencial. Por pertenecer a una ecuación que describe una función exponencial decreciente, la constante lleva signo negativo.

La linealidad de la gráfica del logaritmo natural de las concentraciones tisulares en función del tiempo ($\ln C_t$ vs t), proporciona evidencia que el modelo de un término exponencial es aplicable y que el análisis estadístico de regresión lineal de los datos transformados logarítmicamente, puede ser considerado como método confiable para la estimación del período de retiro. En ese caso, los datos experimentales pueden ser descriptos por la ecuación de primer grado, también conocida como ecuación general de una recta que está dada por la siguiente expresión:

$$y = a + bx$$

donde y es un valor sobre el eje de la ordenada, x es un valor en el eje de la abscisa, a es el punto donde la recta cruza al eje de la ordenada y b indica la cantidad con la cual y cambia por cada unidad de cambio en x . El valor de a se conoce como ordenada en el origen y el valor de b como pendiente de la recta.

El procedimiento que se utiliza para obtener la recta deseada se conoce como método de cuadrados mínimos, y la recta resultante (mejores valores promedios estimados en cada punto de muestreo) se conoce como recta de cuadrados mínimos.

4.1.1. Base de datos

El análisis de regresión lineal requiere que los datos experimentales sean independientes unos de otros. Corrientemente los datos de depleción tisular reúnen esta condición debido a que se originan de diferentes individuos.

En caso de disponer de mediciones duplicadas o triplicadas de concentraciones tisulares de una única muestra, para la realización del análisis de regresión lineal se empleará el valor promedio.

Para evitar el error en el cálculo de la pendiente y el punto de intersección, cada dato de concentración tisular deberá en lo posible, originarse del mismo número de mediciones repetidas.

Como indicación general de acuerdo con la especie animal se debería emplear entre 4 y 10 animales por punto de muestreo (día de sacrificio). Un esquema básico sería disponer de datos de concentraciones tisulares de 16 (dieciséis) animales, los cuales serían sacrificados en grupos de 4 (cuatro) individuos en 4 (cuatro) días de sacrificio convenientemente distribuidos.

Los datos experimentales de concentración tisular que sean mayores al límite de detección (LOD) y menores al límite de cuantificación (LOQ) tienen un valor informativo aunque no estrictamente cuantificable. Por tanto, si es necesario que sean incluidos en el análisis, serán considerados como valores opcionales y su uso deberá ser fundamentado correctamente.

Se deben excluir del análisis los datos experimentales reportados como menores al LOD.

Cuando todos o algunos de los datos experimentales reportados en un día de sacrificio sean “opcionales” deberá considerarse la posibilidad de excluir del análisis al tiempo de sacrificio correspondiente. Debe tenerse en cuenta que se precisa un mínimo de tres puntos de muestreo

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

(días de sacrificio) tomados durante la fase de eliminación terminal y un mínimo de tres muestras (animales) por punto de muestreo para poder realizar un análisis de regresión lineal.

Los datos experimentales de concentración tisular deben ser reportados tal cual ellos fueron cuantificados, es decir sin ser corregidos por los valores de recuperación de la técnica analítica, los cuales deben ser adjuntados con los datos de los experimentos de recuperación y el factor de corrección que deriva de ellos. En este caso, antes de realizar el análisis de regresión lineal, los datos experimentales deben corregirse con el factor de corrección de recuperación antes de ser transformados logarítmicamente. Cuando el ensayo es hecho usando una curva de calibración obtenida con muestras fortificadas antes del proceso de extracción no hay necesidad de realizar corrección por recuperación.

4.1.2. Supuestos del análisis de regresión lineal

Para realizar un análisis de regresión lineal es necesario que se cumplan los siguientes supuestos básicos:

- Que existe homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) entre los \ln de los datos experimentales en cada punto de muestreo (día de sacrificio).
- Que existe linealidad de los \ln de los datos experimentales en función del tiempo.
- Que existe distribución normal (gaussiana) de los errores.

4.1.2.1. Homogeneidad de varianzas (homocedasticidad)

Debe confirmarse que las varianzas de los \ln de los datos experimentales de los diferentes días de sacrificio son homogéneas. Diferentes test estadísticos pueden ser usados para este propósito tales como el test de Bartlett, el test de Hartley y el test de Cochran.

4.1.2.2. Linealidad del \ln de los datos experimentales

La inspección visual de la gráfica de los \ln de los datos experimentales en función del tiempo es a menudo suficiente para asegurar que existe relación lineal entre los datos experimentales.

Un desvío de la linealidad de los \ln de los datos experimentales en los primeros tiempos de muestreo puede indicar que el proceso de distribución de los residuos marcadores aún no ha concluido y por lo tanto estos puntos deberían ser excluidos del análisis.

Desviaciones de la linealidad en los últimos puntos de muestreo pueden ser debidas a concentraciones por debajo del LOD, por lo tanto el proceso cinético de depleción tisular no debe ser considerado en estos tiempos de muestreo y está justificada la exclusión de estos valores del análisis estadístico.

Debe tenerse en cuenta que el resto de los datos experimentales presentes en los restantes puntos de muestreo deben ser conservados, a menos que su exclusión esté debidamente justificada.

Para asegurar estadísticamente la linealidad de la recta de regresión, debe realizarse un análisis de varianza. El procedimiento consiste en comparar la variación entre los grupos de medias y la recta estimada con la variación entre animales dentro de los grupos.

4.1.2.3. Normalidad de los errores

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

La distribución normal de los errores puede ser observada mediante inspección visual de las residuales ordenadas versus su frecuencia de distribución acumulativa en una escala de probabilidad normalizada.

Las residuales, son las diferencias entre los valores observados y sus correspondientes valores estimados (diferencia entre los valores transformados logarítmicamente y los valores estimados por la recta de regresión).

Una línea recta, indica que la distribución de las residuales observada es consistente con el supuesto de una distribución normal. Para verificar los resultados del gráfico de residuales, se puede aplicar el test de Shapiro-Wilk. Este test ha demostrado ser eficaz aún en presencia de muestras pequeñas.

La gráfica de la frecuencia acumulativa de distribución de las residuales puede ser usada como un test muy sensible. Las desviaciones a partir de la línea recta indican una distribución no normal de las residuales, la cual puede ser debida a:

- Desvíos a partir de la normalidad de los datos de las concentraciones tisulares de los residuos marcadores transformados logarítmicamente dentro de uno o más grupos de sacrificio.
- Desvíos a partir de los valores estimados por la regresión lineal (recta de regresión).
- No homogeneidad de varianzas (heterocedasticidad).
- Valores aberrantes.

En la presentación de los datos experimentales usando las residuales normalizadas (residual dividida por el error residual S_y , x), un valor aberrante podría presentar un valor <-4 o $> +4$, indicando que la residual presenta un valor desviado cuatro desvíos estándar de la línea de regresión. El uso que se dé a este tipo de datos deberá ser justificado, teniendo en cuenta la información que se tenga sobre el animal del cual proviene la muestra.

4.1.3. Procedimiento estadístico basado en el LMR

El período de retiro deberá ser calculado usando los resultados de los datos estimados por la línea de regresión. El período de retiro es el tiempo en el que el límite superior del intervalo de tolerancia al 95% estimado con un intervalo de confianza al 95% intersecta al valor del límite máximo de residuos (LMR).

Si este tiempo no corresponde a un día completo, el período de retiro estimado se redondea hasta el día siguiente. Por ejemplo, si el período de retiro estimado es 6,3 días, entonces éste se fija en 7 días.

El valor del límite superior del intervalo de tolerancia al 95% con un intervalo de confianza al 95%, se calculará empleando el método de distribución de t no centralizada que se describe en el anexo.

No es válido estimar el período de retiro a partir de la ausencia de datos de concentración tisular menores al LMR. Por lo tanto, para calcular el mismo se debe disponer de datos experimentales que presenten valores menores al LMR en al menos el último tiempo de muestreo. Dada esta perspectiva se necesita que el LOQ de la técnica analítica sea siempre menor al LMR utilizado. Se recomienda que el LOQ sea al menos la mitad del LMR.

El período de retiro puede ser estimado usando el software WT1.4 recomendado por EMA. El período de retiro también puede ser estimado usando el método desarrollado por Stange, que es

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

propuesto por la EMA. Este es metodológicamente más sencillo de realizar y proporciona resultados comparables al método que emplea la distribución de t no centralizada.

4.1.4 Procedimiento alternativo basado en el LMR

Este procedimiento, también conocido como “regla de decisión” es un método alternativo cuando los datos experimentales disponibles no permiten el uso del modelo estadístico basado en el LMR.

No es posible proponer recomendaciones generales para este procedimiento, ya que los resultados van a depender del tamaño de la muestra, el momento en el que se realice el sacrificio de los animales, la toma de las muestras biológicas, la variabilidad de los datos experimentales y los factores relacionados a la metodología analítica.

El método se basa en fijar el período de retiro, al momento en el que las concentraciones tisulares de todos los animales se encuentren por debajo del valor del LMR. Sin embargo, una vez que se ha estimado este tiempo, debe ser fijado un margen de seguridad para compensar la incertidumbre biológica que representa la variabilidad de la cinética de depleción tisular.

La dimensión del margen de seguridad va a depender de varios factores asociados al diseño experimental y a las propiedades farmacocinéticas del principio activo en estudio.

Aunque no es posible proporcionar una recomendación general aplicable a todos los casos, una guía aproximada para calcular la duración del margen de seguridad es incrementar en un 10% - 30% el valor del tiempo en el que todas las concentraciones tisulares se hallan por debajo del LMR. Otra alternativa es incrementar el mencionado tiempo en un valor equivalente a 1-3 veces la semivida de depleción tisular.

4.2. Tiempo de retiro estimado a partir de los residuos en el sitio de inyección

Además del efecto de la formulación, dosis y frecuencia de administración sobre la duración del período de retiro, éste está influido sustancialmente por la vía de administración. Las formulaciones inyectables pueden presentar una cinética de eliminación de residuos desde el sitio de inyección significativamente más lenta que la observada en el resto de los tejidos comestibles.

Este fenómeno puede atribuirse al diseño de sistemas de liberación lenta, formulaciones de depósito, propiedades físico-químicas de la molécula, la vía de administración subcutánea, intramuscular u otros factores atribuibles a la variabilidad de la vía de administración (ej: en el tejido conectivo entre los músculos semitendinoso y semimembranoso).

A diferencia de otros tejidos, la localización exacta de las muestras de los sitios de inyección destinadas para su análisis puede tener un impacto considerable sobre la concentración de residuos hallada. Además, el metabolismo y/o degradación de los principios activos en el sitio de inyección puede ocasionar que la composición del residuo total pueda ser muy diferente respecto de lo hallado en otros tejidos.

Todo esto muestra que desde un punto de vista farmacológico, el sitio de inyección no es comparable en forma directa con músculo u otros tejidos comestibles. De la misma manera, los períodos de retiro establecidos para tejido muscular de localización remota respecto del sitio de inyección, no son adecuados para garantizar que los residuos presentes en el sitio de inyección hayan disminuido a concentraciones seguras. Hay que tener en cuenta que el procedimiento para calcular los LMR incluye un análisis de riesgo de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos basado en la IDA, la cual considera la exposición dietética a los residuos a lo largo de toda la vida.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Por lo tanto, los residuos en el sitio de inyección necesitan una consideración particular respecto del riesgo para los consumidores de los animales tratados.

4.2.1. Interpretación

Debe tenerse en cuenta que el período de retiro en el sitio de inyección estimado de acuerdo a esta guía, no necesariamente debe ser considerado como el período de retiro definitivo para el producto veterinario en estudio.

El período de retiro en el sitio de inyección debe ser considerado en comparación con los períodos de retiro basados en la depleción de residuos en los otros tejidos comestibles. Finalmente el período de retiro seleccionado para el medicamento veterinario en consideración deberá estar debidamente justificado.

4.2.2. Principios generales

Los residuos de interés que permanecen en el sitio de inyección necesitan ser conocidos. En el caso de los medicamentos veterinarios que contienen nuevos principios activos, es necesario realizar una apropiada caracterización de los residuos relacionados a las moléculas activas, incluyendo metabolitos y productos de degradación y/o conversión de posible impacto biológico. Esta información se obtiene en estudios de depleción de residuos radiométricos (ej. residuo total) o cuando fuere apropiado, en estudios de depleción de residuos orientados a la caracterización toxicológica, farmacológica y microbiológica de los mismos.

Para medicamentos veterinarios que contienen principios activos conocidos y de los cuales se conoce la composición de los residuos en el sitio de inyección, los estudios de depleción de residuos radiométricos no son necesarios, y solo se requiere la valoración del principio activo original o cualquier otro componente relevante del residuo en el sitio de inyección (ej. el residuo marcador). La información referida a la relación entre residuo marcador/residuo total, puede ser obtenida a partir de la información disponible en la literatura.

4.2.3 Diseño del estudio y toma de muestras

Para la toma de muestra se recomienda consultar la Guía n° 1 G.F: “Guía Técnica para la Conducción de Estudios de Metabolismo y Cinética de Residuos de Agentes Farmacológicos de Uso Veterinario en Animales Productores de Alimentos”, ítem 4.6.2

El reporte del estudio de depleción de residuos en el sitio de inyección deberá acompañarse de una descripción completa y detallada del diseño y las condiciones experimentales, la selección del sitio de inyección del producto, la técnica usada para la inyección, el instrumental utilizado, la profundidad de la inyección (intramuscular), medidas tomadas para permitir la localización precisa del sitio de inyección al momento del sacrificio, detalle de la técnica de obtención y acondicionamiento de la muestra.

4.2.4 Procedimiento

Con respecto a la ingestión de residuos en el punto de inyección, como se dijo, debe tenerse en cuenta que se trata de un evento esporádico. Por tanto, la determinación del período de restricción de uso debe basarse en parámetros que permitan cuantificar el riesgo de la exposición dietética a corto plazo. Dependiendo de las características del principio activo, el concepto de la Dosis de Referencia Aguda (ARfD) sería el más adecuado. Sin embargo en algunos casos puede ser más adecuado algún otro parámetro de referencia y también debe tenerse en cuenta que para muchos principios activos la ARfD no está disponible. Para estos casos deberá proponerse y

justificarse algún otro límite de referencia entre los que pueden mencionarse los siguientes: dosis terapéutica humana, cantidad máxima de ingestión recomendada (ej. vitaminas), máximo nivel de ingesta tolerable (ej. minerales/elementos traza), niveles basales o naturales para compuestos que pueden ser producidos de manera endógena (ej. hormonas). Deberá considerarse la aplicación de un factor de seguridad a cualquier límite de referencia que sea seleccionado.

También puede transformarse el LMR de músculo o grasa (de acuerdo a la especie animal o al principio activo que se trate), aplicando un factor de 10 o más en un límite de referencia apropiado para este uso. La selección de cualquier límite de referencia deberá estar justificada.

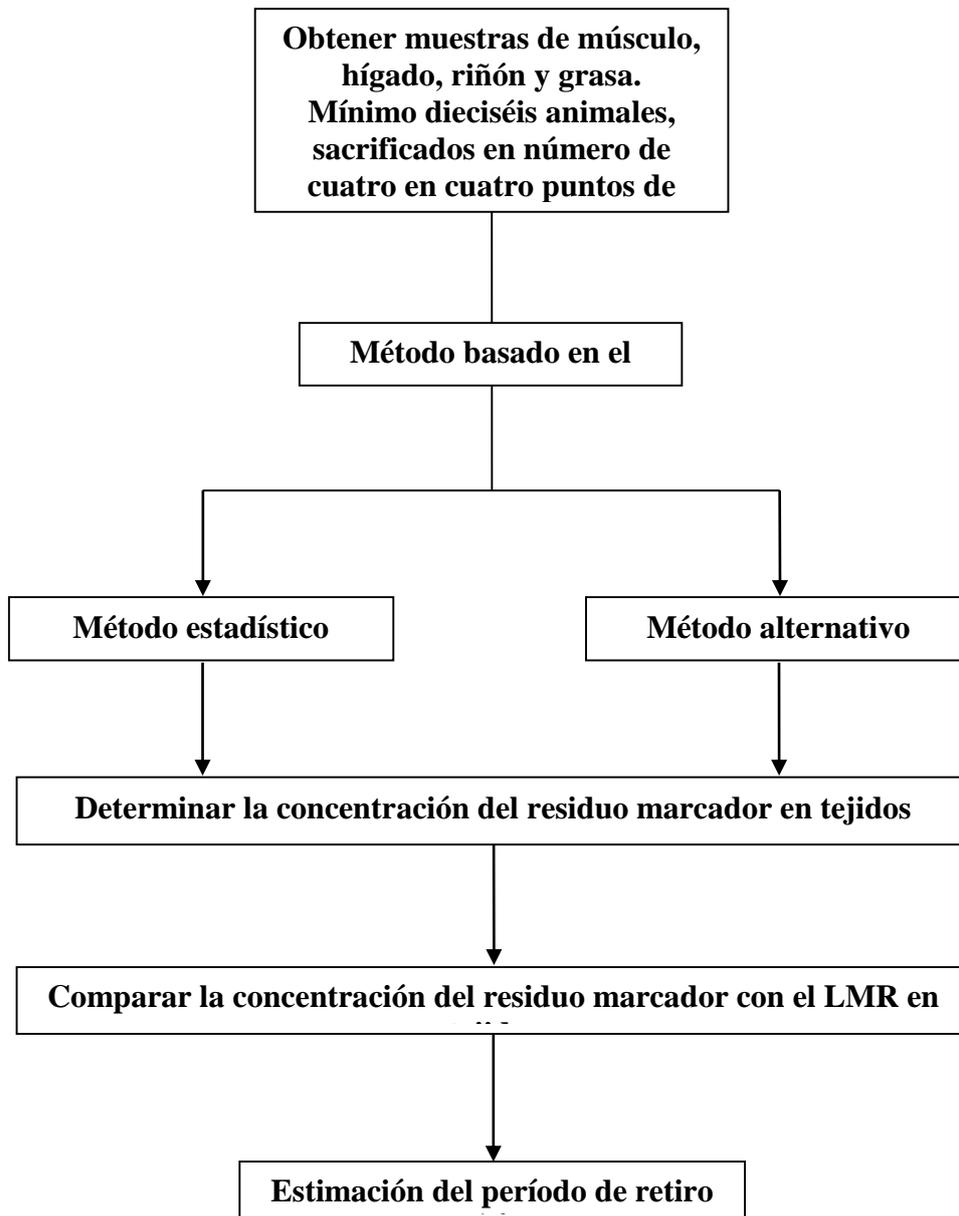
Cuando este procedimiento es aplicado, debe sin embargo corroborarse que el residuo marcador es válido para predecir los residuos de interés en el sitio de inyección.

El tiempo de retiro deberá asegurar que la concentración de los residuos haya disminuido por debajo del límite de referencia seleccionado para el sitio de inyección. Su cálculo deberá ser realizado de acuerdo a lo descripto para los tejidos comestibles en los puntos 4.1.3 y 4.1.4.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

ESQUEMA COMPARATIVO DE MUESTREO Y ANÁLISIS DE LOS TEJIDOS COMESTIBLES Y ESTIMACIÓN DEL PERÍODO DE RETIRO MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO BASADO EN EL LMR.



1- El período de retiro debe ser estimado para todos los tejidos comestibles y será calculado en base a los procedimientos propuestos en esta guía. El período de retiro más prolongado será considerado el más apropiado.

2- Si el producto veterinario se administró por vía parenteral (IM – SC), el período de retiro del tejido muscular será reemplazado por el período de retiro de los tejidos en el sitio de inyección.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

5. Bibliografía

- 1- Bartlett, M. S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests. Proceedings of the Royal Statistical Society Series A 160, 268–282.
- 2- CVMP (1994) Position Paper: Approach towards Harmonisation of Withdrawal Periods, III/5934/94-EN, Nov. 1994.
- 3- David, H.A. (1952). "Upper 5 and 1% points of maximum F-ratio." Biometrika, 39, 422–424.
- 4- EMEA/CVMP/036/95: Note for Guidance: Approach Towards Harmonisation of Withdrawal Periods. (CVMP adopted April 96).
- 5- FDA (1983), General Principles for Evaluating the Safety of Compound Used in Food-Producing Animals.
- 6- FDA (1994), General Principles for Evaluating the Safety of Compound Used in Food-Producing Animals.
- 7- Graf, U.; Henning, H.I.; Stange, P.T. (1987) Wilrich, Formeln und Tabellen der angewandten mathematischen Statistik, 3rd ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio.
- 8- Hartley, H.O. (1950). The Use of Range in Analysis of Variance Biometrika, 37, 271–280.
- 9- O'Brien, R.G. (1981). A simple test for variance effects in experimental designs. Psychological Bulletin, 89, 570–574.
- 10- Owen, D.B. (1962), Handbook of Statistical Tables, Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts.
- 11- Pearson, E.S., Hartley, H.O. (1970). Biometrika Tables for Statisticians, Vol 1.
- 12- Shapiro, S. S.; Wilk, M. B. (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)". Biometrika 52 (3-4): 591–611.
- 13- Stange, K. (1971) Angewandte Statistik, Vol. II, pp. 141-143, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 14- VICH (2009) Guidelines for the validation of analytical Methods used in residue Depletion Studies. VICH International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products, GL 49 (MRK) - Method Used in Residue Depletion Studies. For consultation at step 4 - Draft 1.
- 15- William, J., Conover (1999). Practical Nonparametric Statistics (Third Edition ed.) Wiley, New York, NY USA. pp. 388–395.

6. Anexo

Procedimientos estadísticos

Test de Bartlett

El test de Bartlett, es usado para chequear si un número de k muestras provienen de poblaciones que presentan varianzas similares. La igualdad de varianzas entre diferentes muestras se denomina homogeneidad de varianzas u homocedasticidad.

El uso del test de Bartlett se justifica en el hecho que muchos test estadísticos como por ejemplo el test de diferencias de medias de t -de Student o el análisis de varianza asumen que las varianzas entre diferentes muestras son iguales.

La FDA recomienda el uso de este test debido a su robustez, aunque es extremadamente sensible a desvíos de normalidad. Por otra parte este test solo puede ser usado cuando cada grupo de datos es igual o mayor a 5 (cinco). Presenta la ventaja que se pueden comparar grupos de datos de diferentes tamaños.

El test de Bartlett se usa para chequear la hipótesis nula, H_0 de que las varianzas poblacionales son iguales, respecto de la hipótesis alternativa H_1 de que al menos dos son diferentes. Si disponemos de k muestras con un tamaño de n_i muestras y una varianza S_i^2 el estadístico de Bartlett es:

$$X^2 = \frac{(N - k) \ln(S_p^2) - \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \ln(S_i^2)}{1 + \frac{1}{3(k-1)} \left(\sum_{i=1}^k \left(\frac{1}{n_i-1} \right) - \frac{1}{N-k} \right)}$$

donde $N = \sum_{i=1}^k n_i$ y $S_p^2 = \frac{1}{N - k} \sum_i (n_i - 1) S_i^2$ es el estimador de la varianza total.

El estadístico del test de Bartlett tiene aproximadamente una distribución χ^2_{k-1} . La hipótesis nula es rechazada cuando $X^2 > X^2_{k-1,\alpha}$, donde $X^2_{k-1,\alpha}$, es el valor crítico superior para una distribución χ^2_{k-1} .

Test de Hartley

Este test, desarrollado en 1950 por Hartley, y es también conocido como el test de F_{\max} o el test de F_{\max} de Hartley. Es utilizado en el análisis de varianza para verificar que diferentes grupos tiene varianzas similares, condición indispensable para realizar comparaciones entre grupos mediante la aplicación de test estadísticos paramétricos. El test presenta la desventaja de que solo puede usarse para comparar grupos de datos de igual tamaño.

El test se basa en el cálculo de la relación entre la varianza grupal mayor ($\max s_j^2$) y la varianza grupal menor ($\min s_j^2$). El valor resultante, es entonces comparado con el valor crítico presente en una tabla de distribución de F_{\max} .

Se asume que los grupos presentan varianzas similares si el valor calculado es menor que el valor crítico.

El test de Hartley asume que los datos de cada grupo presentan distribución normal y que los grupos presentan igual número de individuos. Este test, aunque conveniente, es poco sensible a desvíos de distribución normal.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Test de Cochran

Este test, desarrollado por William Gemmell Cochran es un análisis de dos vías de bloques aleatorios, donde el resultado de la comparación solo puede tener dos resultados. El test de Cochran, también conocido como Test Q de Cochran, es un test de estadística no paramétrica.

La EMEA considera que éste es el mejor test, ya que es más sencillo que el test de Bartlett. Por otra parte es menos sensible a desvíos de normalidad que este último y además puede ser usado para analizar grupos de datos de diferente tamaño.

El test asume que el número de tratamientos experimentales es mayor a dos ($k > 2$) y que las observaciones están organizadas en un determinado número (b) bloques tal como se presenta a continuación:

	Tratamiento 1 (k_1)	Tratamiento 2 (k_2)	Tratamiento$_i$ (k_i)
Bloque 1 (b_1)	X_{11}	X_{12}	X_{1k}
Bloque 2 (b_2)	X_{21}	X_{22}	X_{2k}
Bloque 3 (b_3)	X_{31}	X_{32}	X_{3k}
Bloque 4 (b_4)
Bloque$_i$ (b_i)	X_{b1}	X_{b2}	X_{bk}

El test de Cochran parte de la hipótesis nula (H_0) que afirma que los tratamientos son iguales, y la hipótesis alternativa (H_1) afirma que existe diferencia entre los tratamientos.

El estadístico del test de Cochran es:

$$T = k(k - 1) \sum_{j=1}^k \left(X_{\bullet j} - \frac{N}{k} \right)^2 / \sum_{i=1}^b X_{i\bullet} (k - X_{i\bullet})$$

donde

k es el número de tratamientos

$X_{\bullet j}$ es el valor total de las columnas al $j^{\text{ésimo}}$ tratamiento

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

b es el número de bloques

X_{ij} es el valor total de las celdas al $j^{\text{ésimo}}$ bloque

N es el valor del total de las muestras

El nivel de significancia de la región crítica está dado por:

$$T > X_{1-\alpha, k-1}^2$$

donde $X_{1-\alpha, k-1}^2$ es el cuantil $(1-\alpha)$ de la distribución de chi-cuadrado con un grado de libertad de $k-1$. La hipótesis nula es rechazada si el valor del estadístico cae dentro de la región crítica.

Test de Shapiro-Wilk

Este test fue publicado en 1965 por Samuel Shapiro y Martin Wilk, y se lo emplea para chequear la hipótesis nula (H_0) de que una muestra X_1, \dots, X_n proviene de una población con distribución normal.

El test parte de la hipótesis nula (H_0) que afirma que los datos experimentales proviene de una población con distribución normal, y la hipótesis alternativa (H_1) afirma los datos experimentales provienen de una población con distribución no normal. El estadístico del test es el siguiente:

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

donde:

$x_{(i)}$ es el $i^{\text{ésimo}}$ orden estadístico, ej: el menor valor en la muestra

\bar{x} es la media de la muestra.

Las constantes a_i están dadas por la siguiente ecuación:

$$(a_1, \dots, a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$$

donde

$$m = (m_1, \dots, m_n)^T$$

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

m_1, \dots, m_n son valores esperados del orden estadístico de variables independientes y con idéntica distribución aleatoria, provenientes de poblaciones con distribución normal, y V es la matriz de covarianza de esos ordenes estadísticos.

La hipótesis nula se rechaza cuando el valor del estadístico (W) es menor que el error alfa seleccionado (0,05). En caso que el estadístico (W) sea mayor al nivel alfa seleccionado, entonces no se puede rechazar la hipótesis nula y se asume que los datos experimentales provienen de una población con distribución normal.

Cálculo del límite superior del intervalo de tolerancia

Si bien la FDA propone estimar el límite superior del intervalo de tolerancia al 99% con un intervalo de confianza al 95%. Una objeción que se le hace a este criterio, es la excesiva extrapolación de los valores del intervalo de tolerancia, ya que muchas veces este intercepta el valor del LMR en un tiempo posterior a los valores de las últimas concentraciones tisulares detectadas. Esta excesiva extrapolación puede resultar en una inadecuada estimación del tiempo de retiro. La EMEA, propone un intervalo de tolerancia al 95%, lo cual minimiza el problema de la extrapolación y proporciona una estimación más realista del tiempo de retiro.

Método de distribución de t no centralizada (FDA)

El límite superior del intervalo de tolerancia a cualquier tiempo se calcula según la siguiente ecuación:

$$T(y) = a + b.t + k.s. \left[\frac{1}{n} \cdot \left(\frac{t - \bar{xt}}{\sum t_i - \bar{xt}} \right)^2 \right]^{0.05}$$

donde:

k = el 95^{mo} percentil de una distribución de “ t ” no centralizada con un parámetro no centralizado “ d ” y grados de libertad igual a S^2 .

$$d = \frac{z}{\left[\frac{1}{n} \cdot \left(\frac{t - \bar{xt}}{\sum t_i - \bar{xt}} \right)^2 \right]^{0.05}}$$

z = 95^{mo} percentil de una distribución estándar normalizada.

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
 Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
 E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

Para calcular el valor de “*k*”, referirse a D.B. Owen, Handbook of Statistical Tables, Addison-Wesley, Reading, Massachusetts (1962). Empleando el valor de “*d*” y la tabla de factores para el cálculo de los valores críticos de la distribución de “*t*” no centralizada con un percentil del 95% (0,95) y “*n*” grados de libertad.

El límite superior del intervalo de tolerancia se calcula como el antilogaritmo del valor calculado. Inspeccionar que el valor estimado no exceda el valor del LMR, si esto ocurre se debe incrementar el valor de *t* y repetir el procedimiento de cálculo hasta que el valor calculado sea inferior al LMR, en ese caso el valor de *t* se corresponde con el tiempo de retiro.

Método de Stange (EMEA)

El cálculo del límite superior del intervalo de tolerancia al 95% con un intervalo de confianza al 95% puede realizarse también con el procedimiento reportado por de Stange

el cual se describe a continuación:

$$Ty = a + bt + k_T s_{y,x}$$

donde:

Ty = límite superior del intervalo de tolerancia a un tiempo de muestreo determinado

a = punto donde la recta cruza al eje de la ordenada

b = pendiente de la recta

t = tiempo.

$$k_T = \frac{\sqrt{(2n-4)}}{(2n-4)^* - u_{1-\alpha}^2} \left[\sqrt{(2n-4)^*} u_{1-\gamma} + u_{1-\alpha} W_n \right]$$

$$W_n = \sqrt{u_{1-\gamma}^2 + \left[(2n-4)^* - u_{1-\alpha}^2 \right] \left[\frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{s_{xx}} \right]}$$

$$s_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{1}{n} (\sum x_i)^2$$

Los respectivos valores estadísticos de la distribución normal estandarizada son:

- Para $1-\alpha = u_{1-\alpha} = 1.6449$

- Para $1-\gamma = u_{1-\gamma} = 1.6449$

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso “D” (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina

Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165

E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>

$S_{y,x}$ = error residual, $()^* = (2n-5)$ de acuerdo a Graf et al.

La corrección propuesta por Graaf (usando el término $(2n-5)$ en lugar de $(2n-4)$), resulta en un límite del intervalo de tolerancia ligeramente mayor. De acuerdo a Stange, la ecuación es válida para un valor de $n \approx 10$, mientras que Graf incrementa la validez del cálculo a un valor de $n \approx 20$.

Fecha de vigencia

Mayo de 2011

Periodicidad de revisión

5 años

REPRESENTACIÓN REGIONAL DE LA OIE PARA LAS AMÉRICAS.

Avenida Paseo Colón 315, 5to. piso "D" (C1063ACD)- Buenos Aires, Argentina
Tel/Fax: (54-11) 4331-3919 / (54-11) 4331-4939 / (54-11) 4331-5158 / (54-11) 4331-5152 / (54-11) 4331-5165
E-mail: rr.americas@oie.int Web: <http://www.rr.americas.oie.int>