

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Dirección Redes en Salud Pública
Subdirección de Gestión de Calidad de los Laboratorios de Salud Pública
2014-04-25

LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO

CONTENIDO

Objeto	1
Alcance	1
Definiciones	2
Introducción	10
Estandarización	11
Criterios para la selección de un método de ensayo	11
Organización y Personal	12
Instalaciones	12
Equipos, Reactivos, Material y Muestras	12
Sistemas Experimentales	13
Desarrollo del ejercicio de estandarización	14
Validación	16
Validación de Métodos Cualitativos de Análisis Microbiológico	16
Validación de Métodos Cuantitativos de Análisis Microbiológico	24
Validación de Métodos Cuantitativos de Análisis Químico	34
Referencias	52

OBJETO

El presente documento tiene como propósito presentar los lineamientos generales para la estandarización y validación de métodos de ensayo. Se abordan los aspectos técnicos de forma amplia y general de forma que los conceptos aquí mostrados sean aplicables a la gran mayoría de los métodos de ensayo que se utilizan normalmente en los laboratorios dedicados a la vigilancia de eventos de interés en salud pública.

ALCANCE

El presente documento aplica para los LSP que se encuentren en proceso de implementación de sistemas de gestión de calidad basados en las normas NTC GP1000:2009 y NTC ISO/IEC 17025:2005 o que dentro de sus organizaciones se esté proyectando la implementación de sistemas para el aseguramiento de la calidad de los resultados analíticos.

DEFINICIONES

Validación: Verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto. [VIM 2012]

EJEMPLO Un procedimiento de medida habitualmente utilizado para la medición de la concentración en masa de nitrógeno en agua, puede también validarse para la medición en el suero humano.

Validación primaria: Establecimiento de las especificaciones para el desempeño de un nuevo método y/o verificación experimental de que un método cumple criterios de calidad derivados teóricamente. [GTC84:2003]

Validación Secundaria: Demostración mediante experimentos, de que un método establecido funciona de acuerdo con sus especificaciones cuando lo emplea el usuario. [GTC 84:2003].

Revalidación: Repetición total o parcial de la validación de un método analítico debido a modificaciones en el propio método, equipos, muestras a analizar, etc., al objeto de garantizar que los resultados continúan siendo fiables. [AEFI 2000].

Réplicas: Análisis sucesivos de una muestra en las mismas condiciones, utilizando el método analítico completo, desde la preparación de la muestra hasta la medición final del analito. [AEFI 2000]

Repeticiones: Inyecciones o mediciones repetidas de la muestra final (duplicado, triplicado, etc.). [AEFI 2000]

Dato: Se refiere a los atributos cualitativos o cuantitativos de variables o un conjunto de variables.

Dato atípico: Un valor atípico es una observación que es numéricamente distante del resto de los datos. Una observación atípica es la que parece desviarse considerablemente de otros miembros de la muestra en que se produce.

Blanco: Es un sistema físico que no contiene muestra real y por consiguiente no debería contener el analito de interés, pero que debe contener todos los reactivos que se utilizan en el método de análisis y es sometido a las mismas condiciones y procedimientos que las muestras y patrones. [AEFI 2000]

Blanco, placebo o matriz de la muestra: Muestra preparada para la lectura final pero que no contiene analitos. Puede ser un blanco de los reactivos o bien un blanco de la

muestra problema que contenga todos los ingredientes de la muestra problema excepto los analitos. En este último caso se denomina placebo o matriz de la muestra [AEFI 2000]

Relación señal-ruido o Ruido de fondo: En sistemas instrumentales es la señal residual o línea de base registrada con concentración cero de analito. Es decir la señal-ruido que proporciona un blanco o placebo. Matemáticamente suele expresarse como la desviación estándar de la respuesta de un cierto número de blancos. [AEFI 2000]

Exactitud de medida, f exactitud, f: Proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando. [VIM 2012] Para el enfoque de análisis cualitativo, corresponde a la correcta caracterización de muestras positivas/negativas, es decir verdaderos positivos/verdaderos negativos.

NOTA 1 — El concepto “exactitud de medida” no es una magnitud y no se expresa numéricamente. Se dice que una medición es más exacta cuanto más pequeño es el error de medida.

NOTA 2 — El término “exactitud de medida” no debe utilizarse en lugar de “veracidad de medida”, al igual que el término “precisión de medida” tampoco debe utilizarse en lugar de “exactitud de medida”, ya que esta última incluye ambos conceptos.

NOTA 3 — La exactitud de medida se interpreta a veces como la proximidad entre los valores medidos atribuidos al mensurando.

Veracidad de medida, f veracidad, f: Proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. [VIM 2012]

NOTA 1 — La veracidad de medida no es una magnitud y no puede expresarse numéricamente, aunque la norma ISO 5725 especifica formas de expresar dicha proximidad.

NOTA 2 — La veracidad de medida está inversamente relacionada con el error sistemático, pero no está relacionada con el error aleatorio.

NOTA 3 — No debe utilizarse el término “exactitud de medida” en lugar de “veracidad de medida” y viceversa.

Precisión de medida, f precisión, f: Proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas [VIM 2008]

NOTA 1 — Es habitual que la precisión de una medida se exprese numéricamente mediante medidas de dispersión tales como la desviación típica, la varianza o el coeficiente de variación bajo las condiciones especificadas.

NOTA 2 — Las “condiciones especificadas” pueden ser condiciones de repetibilidad, condiciones de precisión intermedia, o condiciones de reproducibilidad (véase la norma ISO 5725-1:1994).

NOTA 3 — La precisión se utiliza para definir la repetibilidad de medida, la precisión intermedia y la reproducibilidad.

NOTA 4 — Con frecuencia, “precisión de medida” se utiliza, erróneamente, en lugar de “exactitud de medida”.

Repetibilidad (de resultados de mediciones): El grado de concordancia entre los resultados independientes obtenidos con el mismo método material de ensayo, en las mismas condiciones (mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y después de breves intervalos de tiempo).

En algunos contextos repetibilidad se puede definir como el valor por debajo del cual se encuentra la diferencia absoluta entre dos resultados individuales obtenidos en las condiciones anteriores, con una probabilidad especificada. [IUPAC 'Orange' Book].

Repetibilidad (de un instrumento de medición): Aptitud de un instrumento de medición para proporcionar indicaciones muy semejantes entre sí por aplicaciones repetidas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición. [IUPAC 'Orange' Book].

Reproducibilidad: El grado de concordancia entre los resultados independientes obtenidos con el mismo método material de ensayo, pero en condiciones diferentes (operadores diferentes, aparatos diferentes, diferentes laboratorios y / o después de diferentes intervalos de tiempo).

En algunos contextos reproducibilidad se puede definir como el valor por debajo del cual está la diferencia absoluta entre dos resultados individuales obtenidos con material idéntico en las condiciones anteriores, con una probabilidad especificada. Se debe tener en cuenta que una declaración completa de la reproducibilidad requiere la especificación de las condiciones experimentales que se modifican. [IUPAC 'Orange' Book].

Precisión Intermedia: Medida de la precisión de los resultados de un método de ensayo en condiciones diferentes de analista/observador, día, equipo y lote de reactivos, dentro del mismo laboratorio. [ICH].

Límite de Detección: Valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α , de declarar erróneamente su presencia. [VIM 2012]

NOTA 1 La IUPAC recomienda por defecto los valores de α y β iguales a 0,05.

NOTA 2 En inglés algunas veces se usa la abreviatura LOD.

NOTA 3 No debe utilizarse el término “sensibilidad” en lugar de “límite de detección”

Límite de Cuantificación: La menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión (repetibilidad) y una exactitud aceptables bajo las condiciones establecidas de la prueba. [NATA Technical Note #17]

Curva de Calibración: Representación gráfica de la señal de medición como una función de la cantidad de analito. [AOAC - PVMC]

Linealidad: capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido. [AEFI 2000]

Residual: Es la diferencia entre el valor observado experimentalmente y el valor estimado en una recta de regresión o una curva de calibración.

Intervalo de Linealidad: Es la amplitud entre las concentraciones inferior y superior del analito (incluyendo estos niveles) en el cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad, utilizando el procedimiento según se describe por escrito. [USP-NF].

Selectividad: Es la capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidas.[NATA Technical Note #17]

Selectividad (en un análisis): Cualitativa - la medida hasta la cual otras sustancias interfieren en la determinación de una sustancia de acuerdo a un procedimiento dado. Cuantitativa - un término usado en conjunción con otros sustantivos (por ejemplo, constante de..., coeficiente de..., índice de..., factor de..., número de...) para la caracterización cuantitativa de interferencias [IUPAC 'Orange' Book]. Para el enfoque de análisis cualitativo, corresponde a la correcta caracterización de muestras negativas, es decir verdaderos negativos.

Especificidad: Se utiliza como sinónimo de la selectividad, aunque debería reservarse para aquellas situaciones, donde la respuesta obtenida solo se puede producir con una única entidad química. [AEFI 2000].

Sensibilidad: 'El cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo.[IUPAC 'Orange' Book]. Capacidad de un método analítico para detectar pequeñas concentraciones de analito. [AEFI 2000] Para el enfoque de análisis cualitativo, corresponde a la correcta caracterización de muestras positivas, es decir verdaderos positivos.

Nota: El estímulo puede ser por ejemplo, la cantidad del mensurando presente. La sensibilidad puede depender del valor de estímulo. Aunque esta definición se aplica claramente a un instrumento de medición, también puede aplicarse al método analítico como un todo, tomando en cuenta otros factores tales como el efecto de los niveles de concentración. [IUPAC 'Orange' Book]

Robustez: Medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando idea de su fiabilidad o estabilidad durante su empleo de rutina. [AEFI 2000].

Material de Referencia: Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas.

NOTA 1 El examen de una propiedad cualitativa comprende la asignación de un valor a dicha propiedad y de una incertidumbre asociada. Esta incertidumbre no es una incertidumbre de medida.

NOTA 2 Los materiales de referencia con o sin valores asignados pueden servir para controlar la precisión de la medida, mientras que únicamente los materiales con valores asignados pueden utilizarse para la calibración o control de la veracidad.

NOTA 3 Los materiales de referencia comprenden materiales que representan tanto magnitudes como propiedades cualitativas.

EJEMPLO 1 Ejemplos de materiales de referencia que representan magnitudes

a) agua de pureza declarada, cuya viscosidad dinámica se emplea para la calibración de viscosímetros.

b) suero humano sin valor asignado a la concentración de colesterol inherente, utilizado solamente como material para el control de la precisión de la medida.

c) tejido de pescado con una fracción másica determinada de dioxina, utilizado como calibrador.

EJEMPLO 2 Ejemplos de materiales de referencia que representan propiedades cualitativas

a) carta de colores mostrando uno o más colores especificados.

b) ADN conteniendo una secuencia especificada de nucleótido.

c) orina conteniendo 19-androstenediona.

NOTA 4 Algunas veces un material de referencia se incorpora a un dispositivo fabricado especialmente.

EJEMPLO 1 Sustancia de punto triple conocido en una célula de punto triple.

EJEMPLO 2 Vidrio de densidad óptica conocida, en un soporte de filtro de transmitancia.

EJEMPLO 3 Esferas de granulometría uniforme montadas en un portamuestras de microscopio.

NOTA 5 Algunos materiales de referencia tienen valores asignados que son metrológicamente trazables a una unidad de medida fuera de un sistema de unidades. Tales materiales incluyen vacunas a las que la Organización Mundial de la Salud ha asignado Unidades Internacionales (UI).

NOTA 6 En una medición dada, un material de referencia puede utilizarse únicamente para calibración o para el aseguramiento de la calidad.

NOTA 7 Dentro de las especificaciones de un material de referencia conviene incluir su trazabilidad, su origen y el proceso seguido.

NOTA 8 La definición según ISO/REMCO es análoga, pero emplea el término “proceso de medida” para indicar “examen” (ISO 15189:2007, 3.4), el cual cubre tanto una medición de la magnitud como el examen de una propiedad cualitativa.

Material de referencia certificado (MRC): Material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos.

Trazabilidad Metrológica: Propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida

NOTA 1 — En esta definición, la referencia puede ser la definición de una unidad de medida, mediante una realización práctica, un procedimiento de medida que incluya la unidad de medida cuando se trate de una magnitud no ordinal, o un patrón.

NOTA 2 — La trazabilidad metrológica requiere una jerarquía de calibración establecida.

NOTA 3 — La especificación de la referencia debe incluir la fecha en la cual se utilizó dicha referencia, junto con cualquier otra información metrológica relevante sobre la referencia, tal como la fecha en que se haya realizado la primera calibración en la jerarquía.

NOTA 4 — Para mediciones con más de una magnitud de entrada en el modelo de medición, cada valor de entrada debiera ser metrológicamente trazable y la jerarquía de calibración puede tener forma de estructura ramificada o de red. El esfuerzo realizado para establecer la trazabilidad metrológica de cada valor de entrada debería ser en proporción a su contribución relativa al resultado de la medición.

NOTA 5 — La trazabilidad metrológica de un resultado de medida no garantiza por sí misma la adecuación de la u

NOTA 6 — La comparación entre dos patrones de medida puede considerarse como una calibración si ésta se utiliza para comprobar, y si procede, corregir el valor y la incertidumbre atribuidos a uno de los patrones.

NOTA 7 — La ILAC considera que los elementos necesarios para confirmar la trazabilidad metrológica son: una cadena de trazabilidad metrológica ininterrumpida a un patrón internacional o a un patrón nacional, una incertidumbre de medida documentada, un procedimiento de medida documentado, una competencia técnica reconocida, la trazabilidad metrológica al SI y los intervalos entre calibraciones (véase ILAC P-10:2002).

NOTA 8 - Algunas veces el término abreviado “trazabilidad” se utiliza en lugar de “trazabilidad metrológica” así como para otros conceptos, como trazabilidad de una muestra, de un documento, de un instrumento, de un material, etc., cuando interviene el historial (“traza”) del elemento en cuestión. Por tanto, es preferible utilizar el término completo “trazabilidad metrológica” para evitar confusión.

Acuerdo: Corresponde a la probabilidad de encontrar el mismo resultado en dos muestras idénticas, analizadas en el mismo laboratorio, bajo condiciones de repetibilidad. [ISO 16140:2003]

Concordancia: Corresponde a la probabilidad de encontrar el mismo resultado en dos muestras idénticas, cuando son analizadas en condiciones de reproducibilidad o precisión intermedia. [ISO 16140:2003]

Desviación Negativa: (Falsos Negativos) Ocurre, en análisis cualitativo, cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. Esta desviación se convierte en un resultado negativo falso cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo. [G-ENAC-04]. Para el enfoque normal de análisis cualitativo, corresponde a muestras que arrojan resultado negativo cuando la correcta caracterización indica que es positivo.

Desviación Positiva: (Falsos Positivos) Ocurre, en análisis cualitativo, cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Esta desviación se convierte en un resultado positivo falso cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo. [G-ENAC-04]. Para el enfoque normal de análisis cualitativo, corresponde a muestras que arrojan resultado positivo cuando la correcta caracterización indica que es negativo.

Las siguientes definiciones están directamente relacionadas con el proceso correspondiente a la estandarización y validación de métodos de análisis microbiológico:

Método de referencia: Método reconocido internacionalmente y ampliamente aceptado. [EN ISO 16140:2003].

Método alternativo: Método de análisis que demuestra o estima para una categoría dada de productos, el mismo analito de la misma forma que el método de referencia. [EN ISO 16140:2003].

Porción de ensayo: Volumen de una suspensión de partículas inoculado en una unidad detectora. [GTC 84:2003].

Intervalo de aplicación: Intervalo de concentraciones de partícula que rutinariamente se someten a medición mediante un método. [GTC 84:2003].

Recuentos paralelos: Cantidades de partículas o colonias en porciones analíticas iguales tomadas de la misma suspensión. [GTC 84:2003].

Detector: Placa de matriz sólida o tubo de líquido que contiene un medio nutriente para el recuento o detección de partículas microbianas vivas. [GTC 84:2003].

Conjunto de detección: Combinación de placas o tubos sobre los cuales se basa el cálculo cuantitativo de concentración microbiana en una muestra. [GTC 84:2003].

Distribución homogénea de Poisson: Distribución completamente aleatoria de cantidades de partículas cuando se muestrea una suspensión perfectamente mezclada. [GTC 84:2003].

INTRODUCCIÓN

Los procesos de estandarización y de validación de los métodos de ensayo son requisitos importantes en la práctica diaria de los laboratorios de análisis. Sin embargo, la percepción de su importancia, por qué deben hacerse y cuándo, y exactamente que necesita hacerse, parece ser deficiente entre el personal encargado de los laboratorios de ensayo. En la literatura técnica existe ya mucha información relacionada a la estandarización y validación de métodos, especialmente en lo que concierne a métodos específicos, pero muy frecuentemente es subutilizada. Algunos analistas ven los procesos de estandarización y validación de métodos como tareas que sólo pueden hacerse en colaboración con otros laboratorios y por consiguiente no la realizan.

El propósito del presente lineamiento es discutir los aspectos técnicos relacionados con los procesos de estandarización y validación de métodos de ensayo e incrementar la comprensión de los lectores de lo que está involucrado, de por qué es importante y dar alguna idea de cómo puede lograrse.

La Subdirección de Gestión de Calidad de Laboratorios de Salud Pública del INS espera que el presente lineamiento sea de gran utilidad para a) los coordinadores de los laboratorios de salud pública, quienes son responsables de asegurar que los métodos de ensayo bajo su responsabilidad están adecuadamente estandarizados y validados y b) los analistas responsables de llevar a cabo estudios sobre los métodos de ensayo con propósitos de estandarización y validación. Igualmente, algún otro miembro de la organización puede encontrar el presente lineamiento como fuente de información de soporte para el personal experimentado y para el personal nuevo una completa herramienta de aprendizaje.

De igual manera, el presente lineamiento está dirigido a aquellos laboratorios de salud pública que presentan la necesidad de estandarizar y validar métodos de ensayo, pero que por diversas condiciones están apenas en proceso de implementación de los métodos de ensayo o que con un sistema medianamente implementado, aún están en condiciones de participar en ensayos interlaboratorios. El presente documento pretende dirigir al lector hacia los protocolos establecidos internacionalmente si éstos existen y cuando no, se da una introducción sencilla al proceso involucrado en la validación y proporciona algunas ideas basadas en conceptos estadísticos, que permitan diseñar sus propias estrategias de validación.

ESTANDARIZACIÓN

La estandarización de un método analítico puede definirse como la demostración, mediante evidencia objetiva – es decir – mediante resultados de análisis, que un método se comporta de conformidad con los requerimientos específicos de un laboratorio o entidad. Actualmente, dada la gran oferta de métodos de ensayo disponibles en el mercado es preciso que las personas a cargo de los laboratorios tengan claridad acerca de los factores que se deben tener en cuenta en el momento de seleccionar los ensayos que se realizan en el laboratorio. A continuación se mencionan los criterios más relevantes al momento de seleccionar un método de ensayo,

Criterios más importantes en la selección de un método de ensayo

En primer lugar, es el laboratorio y sus necesidades los que definen los requerimientos analíticos de los métodos, dichas necesidades usualmente responden a las necesidades de los clientes y a las especificaciones que se encuentren establecidas en la normatividad vigente. Una vez identificadas las necesidades y requerimientos, el método de ensayo puede ser seleccionado. Los criterios de selección del método usualmente responden a las variables matriz de análisis, el rango de análisis, el costo asociado a la realización del ensayo, rapidez del ensayo, la infraestructura con la que el laboratorio cuente al momento de implementar el método, las condiciones de bioseguridad bajo las cuales se realiza el ensayo y la disponibilidad del personal para llevar a cabo el proceso de estandarización de la metodología de ensayo.

Por ejemplo, para la determinación de *E. Coli* en agua para consumo humano, pueden utilizarse dos métodos diferentes (en el ejemplo), un método de filtración por membrana y el otro es un método de sustrato definido. Es el laboratorio quien define que método debe escoger, de conformidad con los costos de realizar los análisis, la rapidez en la obtención del resultado, la infraestructura existente en el laboratorio al momento de realizar la implementación, la experiencia del personal del laboratorio con respecto a los métodos seleccionados. Únicamente después de realizado un análisis de este tipo, el laboratorio puede tener la confianza al seleccionar el método analítico.

Otro aspecto muy importante a tener en cuenta al momento de seleccionar un método para realizar la estandarización es si se cuenta con métodos normalizados para determinar el analito de interés o si, por el contrario, es necesario el desarrollo de un método propio. Dichos métodos normalizados son los que normalmente se encuentran documentados en normas ISO, ASTM, AOAC, USP, Standard Methods, entre otros. La gran ventaja de utilizar los métodos normalizados se debe a que ya se cuenta con información amplia y detallada acerca del desempeño del método de ensayo bajo condiciones normales, por lo tanto la información a obtener en el ejercicio de estandarización consiste en demostrar mediante resultados experimentales, que el método normalizado se comporta dentro de los valores esperados en las condiciones del laboratorio que realiza el ejercicio de estandarización.

Organización y personal

El laboratorio que tiene como objetivo la estandarización de sus métodos de ensayo, debe disponer de una estructura organizacional en la cual las responsabilidades y roles del personal involucrado en las labores de análisis estén claramente definidas en concordancia con las actividades asignadas, igualmente es muy importante que el entrenamiento y calificación del personal involucrado en los ejercicios de estandarización permita que el desarrollo de las competencias técnicas necesarias para desempeñarse en la operación de los métodos de ensayo, toda vez que dicha competencia constituye un elemento crítico para asegurar la confiabilidad de los resultados emitidos por el laboratorio.

De igual manera, la Política de Calidad de la entidad debe constituirse como parte fundamental de la política general del laboratorio, esta debe ser entendida, implementada y mantenida, con una formulación clara y con un plan de formación del personal de la empresa, de forma que se evite la resistencia personal a la implantación de las políticas que permitirán el desarrollo de ejercicios de estandarización. Por lo tanto, la Política de Calidad se debe someter a un constante proceso de mejora, que se relaciona con cuestiones de productividad, creatividad, innovación, necesidades actuales y proyecciones a futuro del laboratorio.

Instalaciones

En cuanto a las instalaciones, el laboratorio deberá contar con las instalaciones adecuadas para la realización de los ensayos, asegurando que el diseño y la distribución de los equipos y reactivos en las áreas no afecte la confiabilidad de los resultados obtenidos a partir del uso de los métodos de ensayo. De esta manera, se garantiza que el entorno en el que se realiza el ejercicio de estandarización no será una fuente adicional de errores aleatorios en los métodos de ensayo que han sido seleccionados. Así mismo, se debe asegurar que el laboratorio cumple con todos los requerimientos técnicos de seguridad industrial y salud ocupacional.

Equipos, reactivos y material

Equipos

Para garantizar la confiabilidad de los resultados en la estandarización de los métodos de ensayo, el laboratorio debe disponer de los equipos necesarios (número y especificaciones técnicas) y de capacidad adecuada para responder a las exigencias de los ensayos que realizan. En este sentido, es preciso resaltar la gran importancia de un Sistema de Gestión Metrológico que garantice que los equipos se encuentran en óptimas condiciones metrológicas y que de acuerdo a la planeación, su desempeño no va a afectar la calidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

Se debe contar con las respectivas instrucciones de manejo y verificación (cuando aplique) de los equipos, las cuales deben estar disponibles en los sitios de operación de los mismos y ser operados por personal entrenado, que tenga la competencia técnica y se encuentre autorizado para el uso de los mismos.

Reactivos

Los reactivos deben tener la calidad requerida por el método de ensayo y la preparación en el laboratorio (si aplica) debe ser realizada por personal calificado. De igual forma la calidad del agua utilizada en el desarrollo del ejercicio de estandarización, debe

controlarse adecuadamente mediante los análisis fisicoquímicos y microbiológicos aplicables según el uso ver GTC 151:2006. Estas actividades deben ser realizadas de acuerdo a procedimientos que el laboratorio tenga documentados.

Material

Se debe contar según aplique, con lineamientos de preparación, manipulación y almacenamiento de los Materiales de Referencia, pues estos son fundamentales durante el desarrollo de un ejercicio, bien sea de validación o de estandarización. De igual manera, el laboratorio debe de garantizar la trazabilidad de la información relacionada con la procedencia, trazabilidad, recepción, almacenamiento y utilización de los mismos.

Se puede contar con diferentes materiales de referencia:

- Procedentes de proveedores externos
- Materiales de referencia primarios
- Materiales de referencia secundarios
- Mezclas o diluciones que se preparan en el laboratorio.

Sistemas experimentales

Los estudios realizados en el laboratorio pueden ser desarrollados a partir de sistemas químicos, físicos, celulares, microbianos y animales.

- **Sistemas físicos y químicos:** La instrumentación empleada para la obtención de datos debe estar correctamente instalada, diseñada y dimensionada. Se podrán utilizar materiales de referencia para verificar estos sistemas experimentales. En los sistemas automatizados, los datos generados se tratarán como datos primarios y se conservarán como evidencia de idoneidad del sistema.
- **Sistemas biológicos:** Para asegurar la calidad de los datos que proporcionan estos sistemas, se crearán y mantendrán condiciones apropiadas según aplique, para el cultivo, mantenimiento, alojamiento, cuidado y/o confinamiento de los mismos. Se debe registrar la información que soporte la idoneidad del sistema, tales como pases, identificación bioquímica, medidas de cuarentena, morbilidad, mortalidad, comportamiento, etc.

El sistema experimental hace parte de las especificaciones del método, el cual a su vez hace parte del sistema analítico.

Desarrollo del ejercicio de estandarización

Antes de hablar de las actividades a realizar durante un ejercicio de estandarización, es preciso mencionar que usualmente un ejercicio de estandarización tiene un alcance limitado, dado que su intención es demostrar mediante evidencia objetiva que el método es capaz de generar resultados estadísticamente válidos y confiables en las condiciones de trabajo del laboratorio, sin embargo, al tratarse de una aproximación inicial el número de ensayos y la complejidad del ejercicio son bajos. Es decir, la estandarización de un método de ensayo es el paso inicial hacia la validación, bien sea primaria o secundaria de un método, toda vez que proporciona al laboratorio un panorama inicial del desempeño del método en las condiciones normales del laboratorio.

Características de aplicabilidad

Dentro del análisis de aplicabilidad, es preciso que el laboratorio evalúe los parámetros de aplicabilidad del método: precisión, sensibilidad, grado de selectividad, tiempo de análisis, tamaño de la muestra, cualificación del personal y se determine si el método seleccionado cumple con el uso previsto y responde de forma adecuada a las necesidades del cliente y se ajusta a la disponibilidad de equipos y materiales del laboratorio. Este estudio inicial se realiza por el área técnica del laboratorio la cual conoce plenamente el método que es objeto de estandarización.

Estudios de estabilidad de la muestra

La estabilidad de la muestra preparada para analizar se evalúa durante la fase de desarrollo del método junto con la robustez. La estabilidad de las disoluciones de la muestra después de su preparación según el método de ensayo, debe ser evaluada de acuerdo al tiempo requerido para su realización. De la misma forma debe demostrarse la estabilidad de las muestras y materiales de referencia preparados si se utilizan durante varios días.

Puesta a punto

La puesta a punto del método de ensayo, incluye desde los primeros estudios de exploración con materiales de referencia, hasta la utilización en muestras reales que garanticen el buen funcionamiento del sistema en el momento del análisis. El estudio de robustez se utiliza para optimizar y ver la criticidad del valor de los parámetros del método antes de validar. A partir de este estudio se definirán las características de idoneidad o conjunto de parámetros que garantizan que el sistema responde en el momento del análisis, a los requisitos fijados.

Características de desempeño

Esta última etapa permite conocer las características de desempeño del método para su aplicación rutinaria.

Las características de desempeño comprenden los cinco criterios fundamentales de validación (no necesariamente aplicables en todos los casos) y de las que se derivan en la práctica todos los parámetros de validación:

- La capacidad de un método para determinar el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación, excipientes u otras sustancias presentes en la muestra. Se relaciona con el término **SELECTIVIDAD**.
- La proporcionalidad entre concentración del analito y respuesta del instrumento. Se relaciona con los términos **LINEALIDAD Y RANGO**.
- La dispersión de una serie de resultados alrededor del valor medio o central. Se relaciona con el término **PRECISIÓN**.
- La diferencia entre el valor hallado en el análisis y el valor verdadero. Se relaciona con el concepto de **EXACTITUD**.
- La cantidad mínima de analito requerida para obtener un resultado significativo. Está relacionada con los términos de **LÍMITE DE DETECCIÓN** y **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**.

VALIDACIÓN

El vocabulario internacional de metrología [VIM 2012] define el término validación como una “*verificación de que los requisitos especificados son adecuados para el uso previsto*”. Más específicamente, la norma técnica colombiana NTC ISO/IEC 17025:2005 define el proceso de validación de un método de ensayo o calibración como “*la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico*”. Por lo tanto, una validación es una confirmación experimental de que el método de ensayo cumple con los criterios definidos para un uso previsto. Dada la gran variedad de métodos de ensayo, el presente lineamiento abordará el esquema de validación desde tres grandes bloques que son: La validación de métodos cualitativos para el análisis microbiológico, la validación de métodos cuantitativos para el análisis microbiológico y la validación de métodos cuantitativos para análisis fisicoquímico.

Validación de Métodos Cualitativos de Análisis Microbiológico

Condiciones Generales

Los métodos de ensayo sobre los cuales se pueden aplicar los criterios definidos en el presente lineamiento pueden ser:

- Métodos biológicos (se basan en la respuesta de biomodelos, células, microorganismos): Inoculación de biomodelos, aislamientos virales, etc.
 - Métodos bacteriológicos (se basan reacciones o determinación presencia/ausencia de bacterias): Análisis presencia/ausencia en diferentes matrices (aguas, material biológico, etc).
 - Métodos parasitológicos: (se basan reacciones o determinación presencia/ausencia de parásitos): Análisis presencia/ausencia de diversos parásitos en diferentes matrices (aguas, material biológico, etc)
 - Métodos de estudio viral (se basan en técnicas biológicas o de biología molecular para identificación de virus): Métodos de PCR, RT-PCR, etc.
- Los lineamientos que se presentan en esta sección corresponden a criterios de orientación general y puede ser necesario consultar la bibliografía relacionada para profundizar en los detalles de aplicabilidad requeridos. En caso de que existan lineamientos relacionados con el método de ensayo para realizar la respectiva validación, emitidos por entes internacionales, nacionales o fabricantes que avalan los métodos adoptados, estos podrán ser aplicados por el laboratorio siendo pues ello una equivalencia de dicho esquema, con lo declarado en el presente lineamiento.
 - Las actividades de validación deben realizarse sobre muestras naturales o, en su defecto, con muestras inoculadas, preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente.

- De acuerdo a los parámetros a estudiar puede ser necesario “fortificar” o “adicionar” las muestras incluidas en el estudio de validación; para ello se deben seguir los procedimientos definidos por el laboratorio para realizar la estandarización previa del inóculo que servirá como muestra concentrada que será adicionada.
- *“Antes de iniciar el proceso de validación, se debe haber trabajado suficientemente con el método de ensayo con el fin de asegurar el conocimiento que ofrezca la garantía de que la validación puede ser satisfactoria” [AEFI 2000].* Los aspectos generales para la estandarización de un método de ensayo cuando se implementa por primera vez en el laboratorio se encuentran definidos en el numeral anterior del presente lineamiento. Únicamente cuando el método de ensayo está plenamente definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados, debe iniciarse el ejercicio validación. A continuación se listan los aspectos relacionados más relevantes:
 - Disponer y revisar detalladamente la norma aplicable (última versión vigente o anterior con justificación técnica de su uso), el procedimiento de análisis documentado por el laboratorio y los documentos relacionados, correspondientes a cada ensayo incluido en el alcance.
 - Realizar un inventario de los materiales y reactivos que se necesitan para la el ejercicio de validación primaria o secundaria: Identificación, precauciones, calidad, cantidad, grado de pureza, etc.
 - Verificación y optimización de las condiciones metrológicas de los equipos. Se debe contar con los respectivos soportes de mantenimiento, calibración y/o calificación según aplique, de conformidad con el esquema de aseguramiento metrológico establecido en el laboratorio.
 - Aseguramiento de las condiciones ambientales relevantes para la ejecución de los ensayos.
 - De acuerdo a la naturaleza del ensayo, el método adoptado y las posibles modificaciones que se introduzcan al mismo, se debe definir el tipo de ejercicio a desarrollar, bien sea de validación primaria o secundaria y de acuerdo a dicho criterio, seleccionar el alcance, extensión y parámetros a incluir en el mismo.

En este punto, es de común uso la aplicación de una lista de chequeo en la que se verifica el cumplimiento en los aspectos previamente citados. Dicho registro sedebe incluir dentro de las evidencias del ejercicio de validación.

Contenido

Extensión del ejercicio de validación

La extensión y enfoque del ejercicio de validación depende fundamentalmente del tipo de metodología analítica que adopta el laboratorio, la naturaleza del mismo y las matrices sobre las cuales se aplique. A continuación se presentan algunos criterios generales:

- El laboratorio utiliza "plenamente" un método normalizado: El laboratorio tiene que verificar que es capaz de alcanzar los rendimientos característicos del método publicados (o que sea capaz de cumplir los requisitos de la tarea analítica); debe realizar estudios de precisión (acuerdo y concordancia), exactitud, sensibilidad, selectividad/especificidad, tasa de falsos negativos y falsos positivos.
- El laboratorio utiliza un método normalizado, pero se quiere aplicar a una nueva matriz: El laboratorio tendrá que verificar que no se identifican nuevas fuentes de error en el sistema cuando se aplica a la matriz en cuestión. El mismo tipo de validación descrito en el ítem anterior es requerido; adicionalmente debe estudiarse el efecto matriz y límite de detección para la nueva matriz.
- El método ha sido publicado en la literatura científica sin características analíticas o se han desarrollado de forma interna: El laboratorio debe realizar estudios de precisión (acuerdo y concordancia), exactitud, sensibilidad, selectividad/especificidad, tasa de falsos negativos, tasa de falsos positivos, efecto matriz y límite de detección.

Diseño experimental del ejercicio

De manera general para llevar a cabo un ejercicio de Validación es necesario definir previamente los aspectos relevantes de ejecución que den respuesta al objetivo que se pretende, los cuales se detallan a continuación:

Objetivo

Se debe definir de manera puntual y concreta cuál es el objetivo del ejercicio, detallando el tipo de validación a realizar, bacteria, virus o parásito target y el respectivo método de ensayo.

Alcance

Se debe definir en forma clara el alcance del ejercicio, lo cual incluye el microorganismo target y las matrices sobre las cuales aplica.

Responsables

Relación del personal responsable de llevar a cabo el ejercicio (analistas) y de los que revisarán y aprobarán los resultados del mismo.

Parámetros a estudiar

Fundamentado en los atributos del método de ensayo y el tipo de ejercicio a desarrollar, se establecen los parámetros a evaluar dentro del estudio, con el fin de determinar las características de desempeño. A continuación se relacionan dichos parámetros, teniendo en cuenta que de acuerdo a la metodología, se puede aplicar un grupo específico de los mismos:

- Acuerdo

En el análisis cualitativo, la variable de acuerdo corresponde al criterio de PRECISIÓN del método de ensayo y es equivalente al enfoque de repetibilidad que se maneja para los métodos cuantitativos.

En el ejercicio de validación, el análisis de “acuerdo” se estructura sobre la base de los resultados obtenidos al evaluar réplicas de materiales de acuerdo al tipo de ensayo en condiciones de repetibilidad, es decir manteniendo constante el Profesional Analista, equipos, muestra, método y realizados en un período de tiempo lo más corto posible.

El análisis de esta variable se fundamenta en determinar la PROBABILIDAD que los resultados obtenidos (positivos o negativos según el enfoque del método) al analizar las réplicas del material de estudio, sean equivalentes entre sí.

De manera consecutiva se van determinando las siguientes probabilidades:

- La probabilidad de obtener un resultado determinado en **una réplica**, mediante la relación entre dicho resultado y el total de muestras analizadas.
- La probabilidad que **un par** de réplicas den resultados iguales, es el cuadrado de la réplica individual.
- La probabilidad que **todas** las réplicas den un mismo resultado entre sí, es la suma de las obtenidas para resultados positivos y negativos.

El ACUERDO se calcula **promediando** las probabilidades de obtener pares con el mismo resultado y luego transformando el dato obtenido a porcentaje.

- Concordancia

En el análisis cualitativo, la variable de “concordancia” corresponde al criterio de PRECISIÓN del método de ensayo y es equivalente al enfoque de reproducibilidad intermedia que se maneja para los métodos cuantitativos.

En el ejercicio de validación, el análisis de “concordancia” se estructura sobre la base de los resultados obtenidos al evaluar materiales de acuerdo al tipo de ensayo en condiciones de precisión intermedia, modificando en el sistema de medición el Profesional Analista y/o el día de ejecución del ensayo (tiempo).

El análisis de esta variable se fundamenta en establecer la **PROBABILIDAD** que cada resultado obtenido (positivo o negativo según el enfoque del método), tenga otro(s) equivalente de todos los resultados generados por los diferentes profesionales analistas o en diferentes días de montaje.

De manera consecutiva se van realizando los siguientes cálculos:

- Establecer el número total de resultados con los que **TEÓRICAMENTE** puede ser comparado cada dato obtenido, realizando posteriormente la respectiva sumatoria.
- Establecer el número de resultados que en la **PRÁCTICA** fueron equivalentes a cada dato obtenido, realizando posteriormente la sumatoria.
- Establecer la relación entre los equivalentes obtenidos en la práctica y los que teóricamente deberían presentarse. Es decir:

$$\frac{\sum \text{Equivalencias obtenidas en el ejercicio}}{\sum \text{Equivalencia que teóricamente deberían presentarse}}$$

- Transformar el dato obtenido a porcentaje.
- Especificidad/Selectividad, Sensibilidad, Exactitud y Tasa de falsos positivos y falsos negativos

Las características de desempeño de un método cualitativo asociadas con la exactitud, especificidad y sensibilidad pueden definirse numéricamente. Estas se relacionan con las proporciones relativas de muestras que se supone son positivos o negativos (según el enfoque del método), sobre la base de la primera impresión (presunta), comparada con la verdadera caracterización de la muestra utilizada.

Después de haber realizado n ensayos, sus resultados se dividen en cuatro categorías:

- Número de muestras positivas, caracterizadas como tal, **VERDADEROS POSITIVOS (VP)**
- Número de muestras positivas, caracterizadas como negativas, **FALSOS NEGATIVOS (FN)**
- Número de muestras negativas, caracterizadas como tal, **VERDADEROS NEGATIVOS (VN)**
- Número de muestras negativas, caracterizadas como positivas, **FALSOS POSITIVOS (FP)**

La caracterización de las muestras como **POSITIVAS** o **NEGATIVAS** en los ensayos cualitativos, tendrá un enfoque particular a cada tipo de ensayo, pudiendo denominarse como:

- Para ensayos de identidad: La muestra POSITIVA corresponderá a aquella que **contiene el analito de interés** y NEGATIVA, la que **no lo contiene**.
- Para ensayos de inocuidad: La muestra POSITIVA corresponderá a aquella que muestra un resultado de **no inocuo** y NEGATIVA, la que muestra un resultado **inocuo**.
- Para ensayo de neutralización: La muestra POSITIVA corresponderá a aquella que **posee el componente capaz de realizar la neutralización** y NEGATIVA, la que **no lo contiene**.

Estas frecuencias se expresan en una tabla de 2 x 2 o tabla de contingencia, la cual permite caracterizar el sistema fundamentado en el concepto de probabilidad, diferenciando las muestras en dos categorías, positivo/negativo y estableciendo una comparación respecto al resultado obtenido mediante un método de referencia, confirmatorio o una caracterización incuestionable.

Resultado obtenido al aplicar el método	Caracterización real de la muestra	
	Positivo (+)	Negativo (-)
Presunto resultado (+)	VP	FP
Presunto resultado (-)	FN	VN

Posteriormente se calculan los siguientes parámetros:

N = Número total de muestras (VP+VN+FP+FN)

N_- = Número de resultados caracterizados previamente como negativos (VN+FP)

N_+ = Número de resultados caracterizados previamente como positivos (VP+FN)

A partir de esta información, se calculan los porcentajes de exactitud, especificidad y sensibilidad así:

Exactitud $(VP+VN/N) * 100$

Fracción de positivos y negativos asignados correctamente

Sensibilidad $(VP/N_+)* 100$

Fracción de los positivos totales correctamente asignada en el presunto resultado

Especificidad/Selectividad $(VN/N.) * 100$

Fracción de los negativos totales correctamente asignados en el presunto resultado

Tasa de falsos positivos $FP / (VN+FP)$

Fracción de los positivos observados, asignados erróneamente

Tasa de falsos negativos $(FN / (VP+FN))$

Fracción de los negativos observados, asignados erróneamente

- Límite de detección

El límite de detección para pruebas cualitativas se describe mejor como "LOD₅₀" o número de organismos por gramo o mililitro de muestra en los cuales el 50% de las pruebas son positivas. El término "LOD₅₀" no tiene el mismo significado que el Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) para los ensayos de naturaleza química; se utiliza para ensayos microbiológicos para definir un rango determinado de partículas (bacterias, virus o macromolécula genética) en el que los métodos son capaces de "detectar" la mínima cantidad de analito en una porción analítica.

El cálculo del LD₅₀ permite tener en cuenta los "fallos" en la detección debidos a homogeneidad incompleta del "analito" en la muestra o suspensión inicial. El estudio experimental se realiza así:

- Se trabajan blancos adicionados con concentraciones que se estiman cercanas al nivel de detección del método de ensayo o muestras naturalmente contaminadas que se diluyen apropiadamente buscando el citado límite.
- Se deben trabajar por lo menos cuatro niveles de concentración y realizar mínimo diez (10) réplicas de cada nivel; adicionalmente debe trabajarse el nivel de cero (0) concentración.
- El cálculo del LOD₅₀ corresponde a la concentración en la cual se evidencia un 50% de resultados positivos y 50% de resultados negativos.
- Se deben calcular los límites de confianza a un 95% de confianza utilizando un método no paramétrico tal como Spearman Karber. Los límites de confianza calculados se asumen con la incertidumbre asociada al LOD₅₀.
- Las estimaciones de los percentiles, como la LOD₉₀ corresponde a la concentración del "analito" en la cual el 90% de los resultados obtenidos son positivos.

- Probabilidad de error asociada al resultado del ensayo

La probabilidad de error asociada al resultado, en métodos cualitativos está directamente relacionada con la estimación de la incertidumbre en la medición, por lo tanto será tratado posteriormente en el presente lineamiento.

Modelo de ejecución

- Categorías y matrices: Se debe especificar el tipo de muestras que se van a utilizar en el ejercicio (naturales, Materiales de Referencia primarios o secundarios, estándares internos, controles de kits comerciales, etc.), detallando la identificación que se va a dar a las mismas y en el caso de Materiales de Referencia, toda la información que soporte la vigencia y trazabilidad respectiva, incluidos los certificados de calidad expedidos por el fabricante. Para las muestras naturales que se emplean, se debe registrar la identificación de la muestra y los datos que soporten la trazabilidad de la información relacionada con su origen y caracterización. De igual forma, de acuerdo a la naturaleza de las muestras, estas pueden ser categorizadas y seleccionadas (por ejemplo por el método de bloques incompletos) de tal forma que se logre una representatividad de las diferentes matrices allegadas para estudio.
- Tamaño de muestra: Debe definirse el tamaño de muestra para el ejercicio, criterio que puede proceder de lineamientos establecidos en publicaciones relacionadas o cálculo estadístico de la misma.
- Obtención de muestras: Se debe declarar la fuente de las muestras y/o materiales de referencia empleados en el ejercicio y la evidencia de que han estado en adecuadas condiciones de almacenamiento.
- Caracterización e identificación de muestras: Se debe detallar la caracterización de las muestras y/o materiales de referencia empleados con evidencia de trazabilidad cuando aplique, así como la identificación que se manejará en el ejercicio, con el fin de tener claridad para el análisis de datos.
- Reactivos: Se deben detallar los reactivos utilizados, especificando lote, vencimiento (si aplica) y anexando los respectivos certificados de análisis o trazabilidad de los mismos.
- Equipos: Se debe realizar un listado de los equipos de medición y auxiliares, detallando su identificación y las especificaciones técnicas e instrumentales de cada uno, según aplique.

Metodología de ejecución

- Fundamento del método de ensayo: Se debe detallar el fundamento del método de ensayo.
- Competencia técnica de los analistas: Se debe presentar de manera resumida la evidencia de competencia técnica del personal analista que participa en el ejercicio.
- Fuente de los datos: La recolección de datos deberá hacerse en formatos de captura de resultados que hacen parte del Sistema de Gestión de Calidad, a partir de los cuales se alimenta el formato que se haya diseñado de acuerdo al tipo de análisis y el parámetro a evaluar.
- Presentación de los datos: Se debe describir la metodología de presentación de los datos, tanto primarios como resultados de análisis para que se reflejen en el Informe de Validación.
- Análisis de datos: Se debe aplicar la metodología de análisis de acuerdo al tipo de ensayo y parámetro a estudiar.
- Criterios de aceptación: En este ítem se deben definir las especificaciones de desempeño del método, de tal forma que se tenga el criterio para comparar los datos obtenidos para los diferentes parámetros evaluados en el ejercicio de Validación. Dichos criterios pueden corresponder individualmente o en conjunto a criterios definidos desde el método de ensayo u objetivos analíticos del laboratorio fundamentados en normatividad vigente y los requisitos del cliente. Cuando dichos criterios no se encuentren documentados, el objetivo del ejercicio será determinarlos.

Validación de Métodos Cuantitativos de Análisis Microbiológico

CONDICIONES GENERALES

Los métodos microbiológicos cuantitativos corresponden a ensayos orientados a determinar los recuentos de microorganismos en una muestra determinada. Para efectos del presente documento, el alcance corresponde a recuentos bacterianos y parasitológicos.

- Los lineamientos que se presentan en este documento corresponden a criterios de orientación general, puede ser necesario consultar la bibliografía relacionada para profundizar en los detalles de aplicabilidad requeridos. En caso de que existan lineamientos relacionados con la metodología para realizar la respectiva validación, emitidos por los entes internacionales, nacionales o fabricantes que avalan los métodos adoptados, estos podrán ser aplicados por el laboratorio siendo equivalente dicho esquema, a lo establecido en el presente documento.

- Las actividades de validación deben realizarse sobre muestras naturales o, en su defecto, con muestras inoculadas, preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente.
- De acuerdo a los parámetros a estudiar puede ser necesario “fortificar” o “adicionar” las muestras incluidas en el estudio de validación; para ello se deben seguir los procedimientos definidos por el laboratorio para realizar la estandarización previa del inóculo que servirá como muestra concentrada que será adicionada.
- Para el análisis de datos es necesario tener claridad que las pruebas estadísticas de estimación y contraste frecuentemente empleadas se basan en suponer que se ha obtenido una muestra aleatoria de una distribución de probabilidad de tipo normal o de Gauss. Pero en muchas ocasiones esta suposición no resulta válida, y en otras la sospecha de que no sea adecuada no resulta fácil de comprobar, por tratarse de muestras pequeñas. En estos casos se dispone de dos posibles mecanismos:
 - Los datos se pueden transformar de tal manera que sigan una distribución normal, por ejemplo la transformación a Log_{10} y Ln aplicable a los recuentos microbiológicos.
 - Aplicar pruebas estadísticas que no se basan en ninguna suposición en cuanto a la distribución de probabilidad a partir de la que fueron obtenidos los datos, y por ello se denominan pruebas no paramétricas (distribución free), mientras que las pruebas que suponen una distribución de probabilidad determinada para los datos se denominan pruebas paramétricas.
- “Antes de iniciar el proceso de Validación, se debe haber trabajado suficientemente con el método de ensayo con el fin de asegurar el conocimiento que ofrezca la garantía de que la validación puede ser satisfactoria” [AEFI 2000]. Los lineamientos generales para el montaje y la estandarización de un método de ensayo cuando se implementa por primera vez en el laboratorio se encuentran en el presente documento. Solo cuando el método de ensayo está plenamente definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados, debe iniciarse el ejercicio validación. A continuación se listan los aspectos relacionados más relevantes:
 - Disponer y revisar la norma aplicable (última versión vigente o anterior con justificación técnica de su uso), el documento que describe el método de ensayo y los documentos relacionados, correspondientes a cada ensayo incluido en el alcance.
 - Inventario de los materiales y reactivos que se necesitan para la Validación primaria o secundaria: Identificación, precauciones, calidad, cantidad, grado de pureza, etc.
 - Verificación y optimización de las condiciones metrológicas de los equipos. Se debe contar con los respectivos soportes de mantenimiento, calibración y/o calificación según aplique, de acuerdo al programa de aseguramiento metrológico.
 - Aseguramiento de las condiciones ambientales relevantes para la ejecución de los ensayos.
 - De acuerdo a la naturaleza del ensayo, el método adoptado y las posibles modificaciones que se introduzcan al mismo, se debe definir el tipo de ejercicio a desarrollar, bien sea de validación primaria o secundaria y de acuerdo a dicho criterio, seleccionar el alcance, extensión y parámetros a incluir en el mismo.

CONTENIDO

Extensión del ejercicio de validación

La extensión y enfoque del ejercicio de validación depende fundamentalmente del tipo de metodología analítica que adopta el laboratorio, la naturaleza del mismo y las matrices sobre las cuales se aplique. A continuación se presentan algunos criterios generales:

- El laboratorio utiliza “plenamente” un método normalizado y/o reconocido por la comunidad científica, aplicado estrictamente sobre las matrices definidas por el mismo: El laboratorio tiene que verificar que es capaz de alcanzar los rendimientos característicos del método publicados (o que sea capaz de cumplir los requisitos de desempeño analítico); debe realizar estudios como mínimo de precisión y proporcionalidad.
- El laboratorio utiliza un método normalizado, pero se quiere aplicar a una nueva matriz: El laboratorio tendrá que verificar que no se identifican nuevas fuentes de error en el sistema cuando se aplica a la matriz en cuestión. El mismo tipo de validación descrito en el ítem anterior es requerido, pero adicionalmente debe realizar estudios de efecto matriz, recuperación y límite de detección.
- El método ha sido publicado en la literatura científica sin características analíticas o se han desarrollado de forma interna: El laboratorio debe realizar estudios de precisión, proporcionalidad, recuperación, exactitud relativa, efecto matriz, límite de detección y robustez.

Diseño experimental del ejercicio

De manera general para llevar a cabo un ejercicio de Validación es necesario definir previamente los aspectos relevantes de ejecución que den respuesta al objetivo que se pretende, los cuales se detallan a continuación:

Objetivo

Se debe definir de manera puntual y concreta cuál es el objetivo del ejercicio, detallando el tipo de validación a realizar, ensayo, analito y el respectivo documento que detalla el método de ensayo.

Alcance

Se debe definir en forma clara el alcance del ejercicio, lo cual incluye el rango de concentraciones (según aplique) y las matrices sobre las cuales aplica, en coherencia con los objetivos de la validación.

Responsables

Relación de las personas responsables que llevarán a cabo el ejercicio (analistas) y de los que revisarán y aprobarán los resultados del mismo.

Parámetros a estudiar

Fundamentado en los atributos del método de ensayo y el tipo de ejercicio a desarrollar, se establecen los parámetros a evaluar dentro del estudio, con el fin de determinar las características de desempeño. A continuación se relacionan dichos parámetros, teniendo en cuenta que de acuerdo a la metodología, se puede aplicar un grupo específico de los mismos:

- Efecto matriz

Por principio el ejercicio de validación primaria o secundaria tendrá como uno de sus objetivos evaluar el comportamiento del método en las diferentes matrices aplicables. Sin embargo, si se decide que dicha aplicación sea gradual o si se identifica la necesidad de trabajar el método con matrices fundamentalmente diferentes a las incluidas, se debe valorar el efecto que la matriz puede tener sobre el resultado de ensayo utilizando herramientas tales como:

- Cálculo de los porcentajes de recuperación en muestras fortificadas: Se preparan inóculos de concentraciones baja y media, con los cuales se fortifican las matrices a evaluar, realizando mínimo seis (6) réplicas. Se evalúa el porcentaje de recuperación promedio de conformidad con los criterios de aceptación establecidos para cada metodología de análisis y/o los establecidos previamente en la validación primaria o secundaria del ensayo.

Aplicación de Índices de Recuperación establecidos por los métodos de ensayo normalizados.

- Precisión: Repetibilidad y Precisión Intermedia

REPETIBILIDAD

La repetibilidad puede ser expresada matemáticamente mediante medidas de dispersión y el valor aceptado depende de si se cuenta con la especificación definida por el método analítico o en caso contrario, estará orientada a definirla desde la validación del mismo. De acuerdo a la naturaleza del método de ensayo se pueden utilizar las siguientes herramientas:

Utilizando la desviación estándar relativa

La desviación estándar relativa (%RSD) de una serie de medidas, las cuales de acuerdo al comportamiento del método deberán ser transformadas para obtener una distribución normal de los datos. Los pasos a seguir son:

- Para cada analista participante ($A_1 \dots A_n$), obtener datos $c_1 \dots c_n$ de duplicados de los recuentos de microorganismos, en condiciones de repetibilidad (mismo analista, mismo método, misma muestra, mismas condiciones ambientales y en un período corto de tiempo).
- Calcular la media y la desviación estándar relativa de cada corrida, aplicando la transformación de datos según se requiera.
- Calcular la media de repetibilidad de cada analista así:

$$\%RSD_{A1} = \sqrt{((RSD_{c1})^2 + (RSD_{c2})^2 + \dots + (RSD_{cn})^2) / n}$$

- A fin de obtener la $\%RSD_r$ agrupada ponderada en donde el laboratorio cuenta con analistas $A_1 \dots A_n$ se realiza el cálculo de la media cuadrática de las repetibilidades personales así: $\sqrt{(RSD_{A1})^2 + (RSD_{A2})^2 + \dots + (RSD_{An})^2} / n$

Utilizando el Límite de repetibilidad

Se calcula la diferencia absoluta entre duplicados de una serie de medidas, las cuales de acuerdo al comportamiento del método deberán ser transformadas para obtener una distribución normal de los datos y se trazan a un límite de repetibilidad el cual corresponde al valor por debajo del cual cabe esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos en condiciones de repetibilidad (misma muestra, mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y breve lapso entre ambos) se encuentre en un margen específico de probabilidad (típicamente 95 %), por lo que $r = 2,8 \times \%RSD_r$.

PRECISIÓN INTERMEDIA

El objetivo del estudio de precisión intermedia es determinar la variabilidad del método, efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio, pero en condiciones operativas diferentes. Típicos factores a estudiar incluyen el día y el analista. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente, sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos. Para este estudio las muestras deben ser preparadas independientemente y analizarse como mínimo por duplicado.

A continuación se plasma un ejemplo para el diseño experimental:

Instrumento A	Analista X	Día 1	Día 2
	Analista Y	Día 1	Día 2
Instrumento B	Analista X	Día 1	Día 2
	Analista Y	Día 1	Día 2

Utilizando la desviación estándar relativa

La estimación de la Precisión intermedia se realiza con el cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa global de las respuestas obtenidas, es decir, considerando cada resultado independientemente. Generalmente se aceptan valores de %RSD de la precisión intermedia, inferiores al doble del %RSD de la repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla, es necesario evaluar cuál es el factor responsable de esta variabilidad.

Utilizando el Límite de repetibilidad

Se calcula la diferencia absoluta entre los resultados de una serie de medidas obtenidas de acuerdo al factor modificado dentro del sistema de medición, las cuales de acuerdo al comportamiento del método deberán ser transformadas para obtener una distribución normal de los datos y se trazan a un límite de reproducibilidad (intermedia) que corresponde al valor por debajo del cual cabe esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos en condiciones de precisión intermedia (material idéntico obtenido modificando uno o más factores en el montaje y utilizando el método de ensayo estandarizado) se encuentre en un margen específico de probabilidad (típicamente 95 %); $R = 2,8 \times \%RDs_R$.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad estudia la variación de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este análisis es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios.

○ Porcentaje de Recuperación

Permite evaluar la cantidad de microorganismo target que el método de prueba es capaz de recuperar cuando una matriz es inoculada con un número conocido de microorganismos. Para realizar el análisis se deben “fortificar” o “adicionar” (matriz spike) muestras naturales, a las cuales por principio se les debe caracterizar su contenido inicial de microorganismos target.

Con los resultados obtenidos de por lo menos seis corridas analíticas montadas por duplicado, se debe calcular la media de la concentración del microorganismo target, realizando las transformaciones requeridas de acuerdo al comportamiento de distribución de los datos. Finalmente se debe calcular el porcentaje de recuperación de acuerdo a lo definido por el método o aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Media de la concentración de microorganismo}}{\text{Concentración de microorganismo inoculada}} \times 100$$

La evaluación de este parámetro de igual forma permite inferir un concepto sobre la exactitud del método.

- o Proporcionalidad

Este parámetro es aplicable a los métodos microbiológicos de recuentos bacterianos y es el equivalente a la “linealidad” en los métodos de análisis químico. El objetivo es determinar la proporcionalidad general de los recuentos de colonias y el volumen de muestra, mediante el cálculo del índice de relación de probabilidad logarítmica (G^2), para la concordancia de las sumas de números de colonias en las placas paralelas (duplicados) con los respectivos volúmenes relativos. En este caso se normalizan los datos de los recuentos obtenidos mediante transformación a logaritmo natural (\ln)

El ejercicio se fundamenta en obtener n recuentos de colonias ($c_1, c_2 \dots c_n$) del estudio de la misma suspensión de ensayo en volúmenes o diluciones que se relacionan con los número $v_1, v_2, \dots v_n$. El cálculo de la relación de probabilidad logarítmica (linealidad) de los recuentos pueden calcularse a partir de:

$$G^2_{n-1} = 2 \left[\sum c_i * \ln c_i/v_i - C * \ln (Z/V) \right]$$

Donde:

c_i Colonias contadas en i^{th} placas

v_i Volumen de la porción de test en la placa

n Número de placas

Z Suma de todos los recuentos de colonias

V Suma de todos los volúmenes

El valor obtenido se compara con el tabulado en las tablas de Chi-cuadrado (X^2) con $n-1$ grados de libertad. Los valores experimentales que exceden el X^2 en tablas indican falta de proporcionalidad a un nivel de probabilidad seleccionado, el cual típicamente será del 95% de confianza.

- o Límite de detección/Límite de cuantificación

Los límites de trabajo confiables se pueden inferir para los métodos microbiológicos desde las especificaciones de los métodos en cuanto a “rangos confiables” para el recuento. Por ello, en caso que el método lo defina, se deben trabajar los extremos del rango para determinar los respectivos Límites de Detección y Cuantificación. Ambas características pueden explorarse mediante el uso del ensayo de proporcionalidad y la repetibilidad o para el caso del Límite de Detección a través de la siguiente metodología:

- Se trabajan blancos adicionados con concentraciones que se estiman cercanas al nivel de detección del método de ensayo o muestras naturalmente contaminadas que se diluyen apropiadamente buscando el citado límite.
- Se deben trabajar por lo menos cuatro niveles de concentración y realizar mínimo diez (10) réplicas de cada nivel; adicionalmente debe trabajarse el nivel de cero (0) concentración.
- El cálculo del LOD_{50} corresponde a la concentración en la cual se evidencia un 50% de resultados positivos y 50% de resultados negativos.
- Se deben calcular los límites de confianza a un 95% de confianza utilizando un método no paramétrico tal como Speerman Karber. Los límites de confianza calculados se asumen con la incertidumbre asociada al LOD_{50} .
- Las estimaciones de los percentiles, como la LOD_{90} corresponde a la concentración del “analito” en la cual el 90% de los resultados obtenidos son positivos.

- Robustez

Las pruebas de robustez incluyen la aplicación de variaciones deliberadas al método y estudiar el efecto resultante en el desempeño. De esta manera es posible identificar las variables que tiene el efecto más significativo y en base a ello, controlarlas cuidadosamente cuando se aplica el método. Cuando se requiere mejorar el método, las mejoras se pueden realizar sobre aquellas partes que se sabe, son críticas. La robustez por lo general se evalúa durante el desarrollo del método y se enfoca hacia determinar el efecto de las variaciones sobre la precisión y la exactitud del método.

- Identificar las variables que pueden tener un efecto significativo en el desempeño del método.
- Establecer experimentos (analizando materiales de referencia, muestras de composición conocida o materiales de referencia certificados) para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente.
- Analizar una vez cada serie de condiciones experimentales.
- Determinar el efecto de cada cambio de condiciones sobre la media.
- Clasificar las variables en orden de mayor a menor efecto sobre el desempeño del método.

Para los métodos microbiológicos, se pueden tener en cuenta variaciones en condiciones de incubación (tiempo, temperatura), efecto de homogenización, tiempos de espera para revivificación de microorganismos, mecánica de homogenización, etc.

En el diseño experimental se debe detallar el esquema de corrida de las muestras para los diferentes parámetros a estudiar, en términos de cantidad, tipo de muestra, días de montaje, entre otros.

Modelo de ejecución

- **Categorías y matrices:** Se debe especificar el tipo de muestras que se van a utilizar en el ejercicio (naturales, Materiales de Referencia primarios o secundarios, estándares internos, controles de kits comerciales, etc.), detallando la identificación que se va a dar a las mismas y en el caso de Materiales de Referencia, toda la información que soporte la vigencia y trazabilidad respectiva (según aplique), incluidos los certificados de calidad expedidos por el fabricante. Para las muestras naturales que se emplean se debe registrar la identificación de la muestra y los datos que soporten la trazabilidad de la información relacionada con su origen y caracterización. De igual forma, de acuerdo a la naturaleza de las muestras, estas pueden ser categorizadas y seleccionadas (por ejemplo por el método de bloques incompletos) de tal forma que se logre una representatividad de las diferentes matrices allegadas para estudio.
- **Tamaño de muestra:** Debe definirse el tamaño de muestra para el ejercicio, criterio que puede proceder de lineamientos establecidos en publicaciones relacionadas o cálculo estadístico de la misma.
- **Obtención de muestras:** Se debe declarar la fuente de las muestras y/o materiales de referencia empleados en el ejercicio y la evidencia de que han estado en adecuadas condiciones de almacenamiento.
- **Caracterización e identificación de muestras:** Se debe detallar la caracterización de las muestras y/o materiales de referencia empleados con evidencia de trazabilidad cuando aplique, así como la identificación que se manejará en el ejercicio, con el fin de tener claridad para el análisis de datos. Para ensayos microbiológicos es ideal utilizar muestras naturalmente contaminadas.
- **Reactivos:** Se deben detallar los reactivos utilizados, especificando lote, vencimiento (si aplica) y los respectivos certificados de calidad, según aplique.
- **Equipos:** Se debe realizar un listado de los equipos críticos, detallando su identificación y las especificaciones técnicas e instrumentales de cada uno, según aplique.

Metodología de ejecución

- **Fundamento del método de ensayo:** Se debe detallar el fundamento del método de ensayo, declarado en el respectivo documento.
- **Competencia técnica de los analistas:** Se debe presentar de manera resumida la evidencia de competencia técnica del personal analista que participa en el ejercicio.
- **Fuente de los datos:** La recolección de datos deberá hacerse en todos los casos, en las hojas de trabajo que sirvan como soporte primario al ejercicio, a partir de los cuales se alimenta el formato que se haya diseñado de acuerdo al tipo de análisis y el parámetro a evaluar.
- **Presentación de los datos:** Se debe describir la metodología de presentación de los datos, tanto primarios como resultados de análisis para que se reflejen en el Informe de Validación.
- **Análisis de datos:** Se debe aplicar la metodología de cálculo de acuerdo al tipo de ensayo y parámetro a estudiar, análisis de datos anómalos, aplicando los test estadísticos pertinentes al tamaño de las muestras y aplicación de herramientas estadísticas de acuerdo a los planteamientos o hipótesis a comprobar.
- **Criterios de aceptación:** En este ítem se deben definir las especificaciones de desempeño del método, de tal forma que se tenga el criterio para comparar los datos obtenidos para los diferentes parámetros evaluados en el ejercicio de Validación. Dichos criterios pueden corresponder individualmente o en conjunto a criterios definidos desde el método de ensayo u objetivos analíticos del laboratorio fundamentados en normatividad vigente y los requisitos del cliente. Cuando dichos criterios no se encuentren documentados, el objetivo del ejercicio será determinarlos.

Informe de validación

El Informe de Validación debe dar respuesta a todos los planteamientos definidos en el diseño experimental del ejercicio de validación. Con este principio, el informe deberá presentar la información relacionada cada uno de los parámetros definidos en el diseño experimental, registrando según aplique, la evidencia o referencia de la misma, de aspectos tales como trazabilidad, consolidados de comportamiento histórico de equipos (según aplique), intervenciones metrológicas a equipos (último mantenimiento, calibración, calificación operacional o verificaciones), condiciones ambientales relevantes (cuando aplique), entre otros. Adicionalmente el Informe debe contener un apartado de conclusiones que presenta la información encontrada fundamentado en los resultados de análisis estadísticos realizados, se definen las conclusiones del estudio, teniendo en cuenta los criterios de aceptación y/o rechazo para las pruebas estadísticas y los lineamientos de los métodos de ensayo para los parámetros específicos.

Revalidación

La revalidación corresponde a la verificación mediante pruebas documentadas de que un método analítico previamente validado, continúa siendo suficientemente fiable en el tiempo o tras realizar modificaciones respecto al método inicial. Se puede requerir en los siguientes casos:

- Paso del tiempo: Para demostrar que el método sigue siendo válido. Típicamente con periodicidad anual se realiza un consolidado de datos obtenidos desde los esquemas de aseguramiento de la calidad y se realiza un re-análisis para robustecer la estimación de los parámetros asociados.
- Cambio en la muestra: Corresponde a la inclusión de nuevas matrices para analizar o modificaciones importantes en la matriz estudiada habitualmente.
- Cambios instrumentales: Cuando se produzcan cambios en los equipos utilizados o en los elementos críticos para su funcionamiento.
- Modificaciones de parámetros analíticos: Cuando se decide realizar alguna modificación en parámetros como tiempos de agitación, proceso de extracción, tiempos de incubación, etc.

Los pasos a seguir son:

- Definir el cambio y documentarlo
- Ver si el cambio está dentro del ámbito de aplicación, parámetros y límites establecidos en el método.
- Determinar el alcance de revalidación a realizar en función del cambio.
- Realizar la validación de los parámetros definidos.

El alcance de revalidación depende de la naturaleza de los cambios realizados. A continuación se presenta un modelo orientativo de aplicación:

CAMBIO	PROPUESTA DE PARÁMETROS A EVALUAR
MATRIZ	Efecto matriz Precisión Recuperación Proporcionalidad Límite de detección

CAMBIO	PROPUESTA DE PARÁMETROS A EVALUAR
INSTRUMENTAL	Precisión Recuperación
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	Precisión Recuperación Límite de detección

Validación de Métodos Cuantitativos de Análisis Químico

CONDICIONES GENERALES

Los métodos que emplea el análisis químico cuantitativo pueden ser:

- Métodos químicos (se basan en reacciones químicas) o clásicos: Análisis volumétrico y análisis gravimétrico
- Métodos fisicoquímicos (se basan en interacciones físicas) o instrumentales: Métodos espectrofotométricos, métodos electroanalíticos, métodos cromatográficos
- Métodos inmunoquímicos (se basan en complejos inmunes, es decir resultantes de conjugación de antígeno-anticuerpo): Métodos de ELISA, EIA, RIA, IFI, etc.
- Los lineamientos que se presentan en este documento corresponden a criterios de orientación general, puede ser necesario consultar la bibliografía relacionada para profundizar en los detalles de aplicabilidad requeridos. En caso de que existan lineamientos relacionados con la metodología para realizar la respectiva validación, emitidos por los entes internacionales, nacionales o fabricantes que avalan los métodos adoptados, estos serán aplicados por el laboratorio siendo equivalente dicho esquema, al cumplimiento del presente documento.
- Solo cuando el método de ensayo está plenamente definido en todos sus detalles y se tiene el convencimiento de que las condiciones descritas son idóneas para alcanzar los resultados esperados, debe iniciarse el ejercicio validación. A continuación se listan los aspectos generales, previos a la realización de un ejercicio de validación más relevantes:
 - Disponer y revisar la norma aplicable (última versión vigente o anterior con justificación técnica de su uso), el documento que describe el método de ensayo y los documentos relacionados, correspondientes a cada ensayo incluido en el alcance.
 - Inventario de los materiales y reactivos que se necesitan para la Validación primaria o secundaria: Identificación, precauciones, calidad, cantidad, grado de pureza, etc.
 - Verificación y optimización de las condiciones metrológicas de los equipos. Se debe contar con los respectivos soportes de mantenimiento, calibración y/o calificación según aplique, de acuerdo al programa de aseguramiento metrológico.
 - Aseguramiento de las condiciones ambientales relevantes para la ejecución de los ensayos.

- De acuerdo a la naturaleza del ensayo, el método adoptado y las posibles modificaciones que se introduzcan al mismo, se debe definir el tipo de ejercicio a desarrollar, bien sea de validación primaria o secundaria y de acuerdo a dicho criterio, seleccionar el alcance, extensión y parámetros a incluir en el mismo.

CONTENIDO

Extensión del ejercicio de validación

La extensión y enfoque del ejercicio de validación depende fundamentalmente del tipo de metodología analítica que adopta el laboratorio, la naturaleza del mismo y las matrices sobre las cuales se aplique. A continuación se presentan algunos criterios generales:

- El laboratorio utiliza "plenamente" un método normalizado: El laboratorio tiene que verificar que es capaz de alcanzar los rendimientos característicos del método publicados (o que sea capaz de cumplir los requisitos de la tarea analítica); debe realizar como mínimo estudios de precisión, exactitud y si aplica linealidad.
- El laboratorio utiliza un método normalizado, pero se quiere aplicar a una nueva matriz: El laboratorio tendrá que verificar que no se identifican nuevas fuentes de error en el sistema cuando se aplica a la matriz en cuestión. El mismo tipo de validación descrito en el ítem anterior es requerido y adicionalmente debe realizarse el estudio de efecto matriz.
- El método ha sido publicado en la literatura científica sin características analíticas o se han desarrollado de forma interna: El laboratorio debe realizar estudios de precisión, sesgo (incluidos estudios de efecto matriz), cuando aplique linealidad y robustez. Es adecuado confrontarlo con otro método plenamente estandarizado y validado en el laboratorio, que sea comparable al primero. Cuando se trata de un método de desarrollo propio, se deben considerar incluir en la validación todos los parámetros según corresponda ejemplo: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, robustez, precisión, exactitud, especificidad, etc.

Diseño experimental del ejercicio

De manera general para llevar a cabo un ejercicio de Validación es necesario definir previamente los aspectos relevantes de ejecución que den respuesta al objetivo que se pretende, los cuales se detallan a continuación:

Objetivo

Se debe definir de manera puntual y concreta cuál es el objetivo del ejercicio, detallando el tipo de validación a realizar, ensayo, analito y el respectivo documento que detalla el método de ensayo.

Alcance

Se debe definir en forma clara el alcance del ejercicio, lo cual incluye el rango de concentraciones (según aplique) y las matrices sobre las cuales aplica, en coherencia con los objetivos de la validación.

Responsables

Relación de las personas responsables que llevarán a cabo el ejercicio (analistas) y de los que revisarán y aprobarán los resultados del mismo.

Parámetros a estudiar

Dependiendo del tipo de ensayo (normalizado, normalizado modificado, reconocido por la comunidad científica, o desarrollado internamente), en los atributos del método de ensayo y el tipo de ejercicio a desarrollar, se establecen los parámetros a evaluar dentro del estudio, con el fin de determinar las características de desempeño. A continuación se relacionan dichos parámetros, teniendo en cuenta que de acuerdo a la metodología, se puede aplicar un grupo específico de los mismos:

- Estudio de estabilidad

Dado que la estabilidad del analito tiene influencia directa los parámetros que se estudian durante la Validación primaria o secundaria, cuando se considere necesario demostrar la estabilidad de las muestras allegadas para estudio, controles de kit comerciales y/o las soluciones de materiales de referencia, se pueden evaluar los siguientes aspectos según de determine como necesario:

- Muestras:
 - Tiempo de transporte al laboratorio y condiciones de refrigeración durante dicho período
 - Tiempo y condiciones de almacenamiento en el laboratorio
 - Efectos de congelación-descongelación de muestras
 - Tiempo comprendido entre su preparación y la finalización del análisis, especialmente en aquellos métodos en los cuales las muestras permanecen por períodos prolongados de tiempo en el equipo, para ser analizados.
- Controles de kit comerciales, materiales de referencia y soluciones de materiales de referencia:
 - Tiempo y condiciones de almacenamiento en el laboratorio
 - Tiempo comprendido entre su preparación y la finalización del análisis, especialmente en aquellos métodos en los cuales los materiales de referencia o sus soluciones permanecen por períodos prolongados de tiempo en el equipo, para ser analizados.

Es importante destacar que el estudio de estabilidad debe situarse de forma racional, dentro de lo que se considera la “práctica real” y la rutina de análisis del laboratorio o del

transporte de las muestras, por lo cual, no será necesario establecer la estabilidad en un plazo que exceda el tiempo definido según la naturaleza del ensayo, muestra, control o material de referencia.

De manera general, el ejercicio se puede desarrollar mediante corrida de tres alícuotas del material (muestras, controles, materiales de referencia) de concentraciones alta, media y baja (cuando aplique) y en todos los casos dentro del rango de aplicación del método, en las situaciones que se definan van a ser evaluadas. Las particularidades en concentraciones y tiempos de análisis o almacenamiento, deben establecerse desde el diseño experimental y detallarse en el respectivo Informe de Validación.

La metodología se fundamenta en mediciones iniciales del analito (basales) y mediciones posteriores luego de almacenamiento en condiciones controladas, durante un período de tiempo relevante según los lineamientos del método analítico y las propiedades del analito. La estabilidad se determinará por comparación de los datos basales y la respuesta obtenida luego del almacenamiento mediante herramientas como:

- Porcentaje de recuperación: Se puede establecer mediante un criterio estadístico que demuestre si existe o no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%.
- Comparación de medias: Utilizando herramientas estadísticas tales como un análisis ANOVA.

En caso de que se evidencia incumplimiento frente al criterio establecido, se deben analizar, revisar y ajustar los factores que se establezca, están influyendo en la estabilidad de la muestra, control y/o materiales de referencia.

- Efecto matriz

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito de interés debido a la presencia de otros componentes. En otras palabras, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una solución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental. La evaluación del efecto matriz se realiza de acuerdo a la naturaleza de las muestras que se analizan y a la metodología para el cálculo de la concentración del analito, de acuerdo a los siguientes lineamientos

- Comparación de la recta de regresión obtenida sobre el analito puro, con la correspondiente a analito + matriz. Para determinar este efecto matriz se preparan soluciones del analito en concentración baja, media y alta y se corren como mínimo tres réplicas de cada una. De igual forma se procesan soluciones

a las cuales se agrega la matriz y se procede a su cuantificación y análisis de datos. Para el caso de curva de calibración, la no correspondencia de las rectas indica problemas por efecto de la matriz y está relacionada con la exactitud del método en cuestión. Estos efectos de matriz pueden clasificarse de acuerdo a su naturaleza en aditivos y multiplicativos. Los aditivos se refieren a un desplazamiento positivo del cero en presencia de la matriz y los multiplicativos a un cambio de la pendiente.

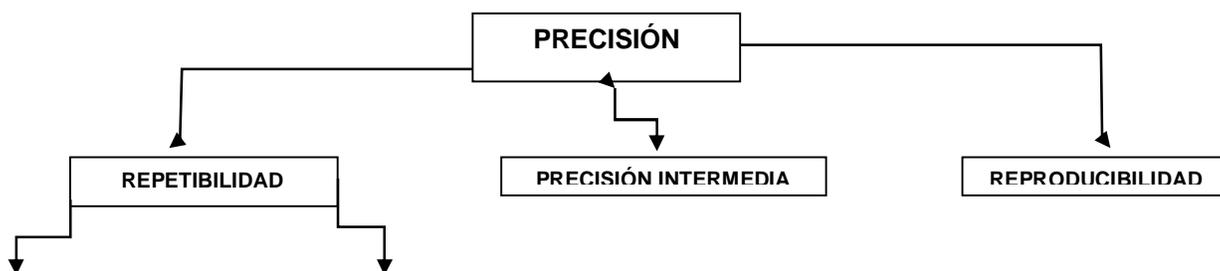
- Método de adiciones estándar: Los patrones utilizados en las curvas de calibración frecuentemente difieren en cuanto a su matriz, de las muestras incógnitas a determinar, lo que puede ocasionar efectos indeseados respecto de la exactitud del análisis. Tal consecuencia (efecto matriz) puede evaluarse por medio del método de las adiciones estándar, que puede evaluarse por las siguientes metodologías:
- Agregar sobre la misma muestra incógnita, cantidades conocidas del analito en estudio que posteriormente se analizarán instrumentalmente. A continuación ha de representarse la curva y verificarse su linealidad. Para obtener el valor de concentración del analito en la muestra incógnita debe extrapolarse la ecuación de la recta de la curva a $y = 0$.

Otra forma de evaluar el efecto matriz es a partir del cálculo de los porcentajes de recuperación en muestras adicionadas. Se preparan estándares de concentraciones baja y alta y se realiza el análisis (10 repeticiones). Se evalúa el porcentaje de recuperación promedio de conformidad con los criterios de aceptación establecidos para cada metodología de análisis.

- Precisión: Repetibilidad y Precisión Intermedia

REPETIBILIDAD

La repetibilidad se expresa matemáticamente mediante la desviación estándar de una serie de medidas. El valor aceptado, depende de la especificación definida por el método analítico.



REPETIBILIDAD
INSTRUMENTAL

REPETIBILIDAD
DEL MÉTODO

Repetibilidad del sistema instrumental

Este parámetro estudia la variabilidad debida al instrumento y se determina analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva de 6 a 10 veces o utilizando los datos de las curvas de calibración preparadas para la comprobación de la linealidad.

La estimación de la repetibilidad instrumental se realiza con el cálculo de la desviación estándar relativa de las respuestas obtenidas. El criterio de aceptación puede ser variable y está definido por los objetivos analíticos y la naturaleza del método de ensayo.

Repetibilidad del método

El ensayo de repetibilidad del método se realiza sobre una serie de alícuotas, de una muestra homogénea que se analiza independientemente desde el principio (preparación de la muestra) hasta el final (lectura de resultados) por el mismo instrumento y el mismo analista. Según el caso, se puede trabajar alguno de los modelos presentados en la bibliografía relacionada tales como:

- Un mínimo de seis (6) muestras a una sola concentración [ICH]
- Un mínimo de tres muestra a tres niveles de concentración, cubriendo el intervalo del método. [ICH]
- Un mínimo de diez repeticiones de muestras a varios niveles de concentración. [EURACHEM]

Relación de los coeficientes de variación

Los valores aceptables del coeficiente de variación del sistema instrumental deben ser inferiores a los valores que se aceptan para el método. La expresión matemática que permite relacionar ambos coeficientes de variación es:

$$CV \text{ método} = CV \text{ sistema} * \sqrt{2}$$

[Asociación Española de Farmacéuticos de La Industria - Validación de métodos analíticos. Barcelona. 2001 Parte I]

Intervalos de confianza

Es recomendado introducir los intervalos de confianza en el estudio de la precisión. Estos intervalos deben determinarse para cada nivel de concentración estudiado. Cuando el número de muestras es pequeño (inferior a 30), las medidas independientes y la distribución normal, pueden calcularse de acuerdo a la distribución t de Student según:

$$x - (t_{v, \alpha} * s / \sqrt{n}) < \mu < x + (t_{v, \alpha} * s / \sqrt{n})$$

Donde:

s Desviación estándar

$t_{v, \alpha}$ Es el valor de t de Student tabulado para n mediciones con $v = n - 1$ grados de libertad y para varios niveles de significación (el nivel más usado es de $\alpha = 0.05$, que corresponde a un nivel de confianza del 95%)

Límite de repetibilidad

Corresponde al valor por debajo del cual cabe esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos en condiciones de repetibilidad (misma muestra, mismo operador, mismo aparato, mismo laboratorio y breve lapso entre ambos) se encuentre en un margen específico de probabilidad (típicamente 95 %), por lo que $r = 2,8 \times s_r$, en donde s_r corresponde a la desviación tipo, calculada a partir de resultados obtenidos en condiciones de repetibilidad.

PRECISIÓN INTERMEDIA

El objetivo del estudio de precisión intermedia es determinar la variabilidad del método, efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, en un mismo laboratorio, pero en condiciones operativas diferentes. Típicos factores a estudiar incluyen el día y el analista. No es necesario estudiar cada uno de estos factores individualmente, sino que es suficiente comprobar que la variabilidad aportada por el conjunto de factores está dentro de los límites establecidos. Para este estudio las muestras deben ser preparadas independientemente y analizarse como mínimo por duplicado.

A continuación se plasma un ejemplo para el diseño experimental:

Instrumento A	Analista X	Día 1	Día 2
	Analista Y	Día 1	Día 2
Instrumento B	Analista X	Día 1	Día 2
	Analista Y	Día 1	Día 2

La estimación de la Precisión intermedia se puede realiza mediante herramientas tales como el cálculo del porcentaje de desviación estándar relativa global de las respuestas obtenidas, es decir, considerando cada resultado independientemente. Generalmente se aceptan valores de %RSD de la precisión intermedia, inferiores al doble del %RSD de la repetibilidad del método. En caso de que no se cumpla, es necesario evaluar cuál es el factor responsable de esta variabilidad.

Otra forma de evaluar la precisión intermedia, es a través de una prueba F de comparación de varianzas realizando la comparación de las varianzas de las diferentes series de datos. La precisión intermedia se comprueba únicamente sí el comparativo F de Fischer calculado para la serie de datos es menor al valor F que se encuentra en las tablas.

Límite de reproducibilidad intermedia

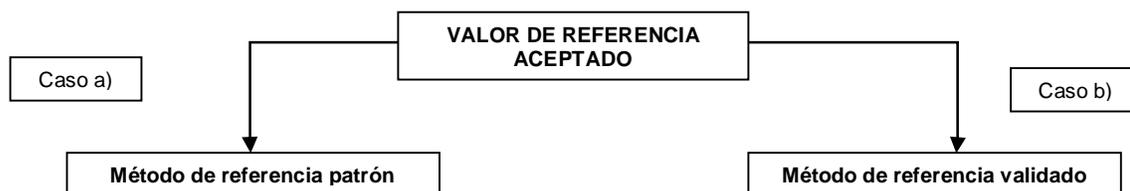
Corresponde al valor por debajo del cual cabe esperar que la diferencia absoluta entre dos resultados de prueba obtenidos en condiciones de precisión intermedia (material idéntico obtenido modificando uno o más factores en el montaje y utilizando el método de ensayo estandarizado) se encuentre en un margen específico de probabilidad (típicamente 95 %); $R = 2,8 \times s_R$, en donde s_R corresponde a desviación tipo, calculada a partir de resultados obtenidos en condiciones de reproducibilidad o precisión intermedia.

REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad estudia la variación de los resultados inter-laboratorio. El objetivo de este análisis es verificar que el método de análisis proporciona los mismos resultados en diferentes laboratorios.

- Exactitud

Cuando se dispone de materiales de referencia certificados (caso a) Figura), el valor de dicho material es el que se acepta como valor verdadero y la exactitud puede evaluarse, desde el citado valor. También se acepta la comparación de los resultados con un método de referencia validado, del que se haya demostrado su exactitud (caso b) Figura); entonces el valor verdadero es el que se obtiene con dicho método de referencia y se compara con el valor hallado con el método alternativo que se quiere validar.



De acuerdo a la naturaleza del método, pueden adoptarse diferentes metodologías para el cálculo de la exactitud, a continuación se detallan algunas de ellas:

Porcentaje de recuperación

Se evalúa si el porcentaje de recuperación media es satisfactorio y para confirmar se aplica un test t de Student:

$$t_{\text{exp}} = |100 - \bar{x}| * \sqrt{n} / CV$$

Se halla el t_{tablas} para un $\alpha=0.05$ y $(n-1)$ grados de libertad.

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%, por lo que la exactitud es correcta.

Comparación con un método de referencia validado mediante ANOVA

Las mismas soluciones que se trabajan para evaluar la exactitud del método, se corren por las metodologías alternas que se quieren valorar frente al método de referencia. Se comparan los resultados obtenidos con el método analítico que se quiere validar (Método A) con los obtenidos con el método de referencia (Método B), cuya exactitud está bien determinada o definida; teniendo en cuenta que ambos métodos deben ser independientes.

Se realiza un tratamiento estadístico de comparación de dos medias de series no apareadas mediante la aplicación de un ANOVA (Test de Snedecor-Fisher (F) y Test t de Student con la varianza conjunta). Este test está disponible en las herramientas estadísticas del programa Excel. Sin embargo, a continuación se explica el modelo:

$$\text{Test de F: } F_{\text{exp}} = s^2_A / s^2_B$$

Se halla F_{tablas} (g_A ; g_B ; $\alpha=0.05$). Al ser $F_{\text{exp}} < F_{\text{tablas}}$ significa que ambos métodos tienen varianzas estimadas iguales y por lo tanto, precisiones semejantes.

Como consecuencia de que las varianzas son homogéneas, se puede aplicar el test t de Student. En caso contrario, aplicar un test t para varianzas no homogéneas.

$$\text{Test de t: } t_{\text{exp}} = (\bar{x}_A - \bar{x}_B) / \sqrt{(s^2/n_A) + (s^2/n_B)}$$

Donde s^2 es la varianza conjunta, que se calcula a partir de la expresión:

$$S^2 = (n_A - 1) s^2_A + (n_B - 1) s^2_B / (n_A - 1) + (n_B - 1)$$

Se halla el t_{tablas} ($gl = (n_A + n_B) - 2$) y $\alpha = 0.05$). Al ser $t_{exp} < t_{tablas}$ significa que no hay diferencia entre las dos medias.

Utilizando un Material de Referencia Certificado

Para verificar la exactitud utilizando un material de referencia, se determina la media y la desviación estándar de una serie de diez (10) réplicas y se compara contra el valor caracterizado del material de referencia. Los materiales de referencia para la validación pueden ser preparados por adición de materiales típicos con materiales de referencia de pureza certificada u otros materiales de pureza y estabilidad adecuadas.

La exactitud se evaluara como el promedio de los porcentajes de error relativo con respecto al valor reportado en los certificados de trazabilidad del material estudiado.

Métodos que utilizan curva de calibración analítica

Se deben analizar diez (10) replicas o repeticiones (según se trabaje con soluciones preparadas o con materiales de referencia) de la misma concentración en cada uno de los rangos: bajo, medio y alto del rango lineal. Se les aplica el procedimiento analítico respectivo, como si fuera una muestra y se determinan sus concentraciones, haciendo uso de la curva de calibración preparada para la determinación de la linealidad. Con los promedios de los resultados obtenidos para cada concentración se hará la regresión lineal por mínimos cuadrados para establecer la curva de calibración.

empleando la siguiente fórmula:

$$|t| = |(\bar{x} - \mu) * \sqrt{n/s}|$$

Donde:

\bar{x} Valor promedio experimental

μ Valor teórico o verdadero

n

Número de muestras

s

Desviación Estándar (de las concentraciones

calculadas en la curva de calibración)

Comparar los resultados del t experimental, con la t de la tabla, considerando el siguiente criterio: $t_{exp} \leq t_{critico\ tabla}$. Si se cumple lo anterior para el número de grados de libertad correspondiente a $(n-1)$, en un nivel de confianza del 95%, se puede considerar que los valores son exactos.

Influencia de la concentración sobre la exactitud

Para determinar si el factor de concentración tiene alguna influencia en los resultados, se utiliza un test de igualdad de varianzas de varios grupos muestrales del mismo tamaño, que puede ser el test de Cochran:

$$G_{\text{exp}} = s^2_{\text{max}} / s^2_1 + s^2_2 + s^2_3$$

Se determina el G_{tablas} ($\alpha=0.05$; k ; n), donde k es el número de grupos y n el número de determinaciones por grupo.

Al ser $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$, significa que las varianzas de las tres concentraciones utilizadas son equivalentes, es decir, que el factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

- Linealidad

Se debe demostrar la linealidad de la respuesta del analito en el rango de trabajo establecido por el método analítico escogido. El problema de la calibración analítica se reducirá a encontrar las estimaciones de los coeficientes de la recta de calibrado (ordenada en el origen y pendiente), y a asegurar que la recta encontrada se ajusta correctamente a los puntos experimentales (es decir, asegurar que no hay falta de ajuste).

El método más universalmente empleado para encontrar los coeficientes de la recta de calibrado es el método de mínimos cuadrados, el cual busca la recta de calibrado que haga que la suma de los cuadrados de las distancias verticales entre cada punto experimental y la recta de calibrado sea mínima.

Evaluación del modelo de línea recta

- Preparar una solución stock de la sustancia que se desea cuantificar y un blanco de reactivos.
- Preparar cinco (5) soluciones stock independientes en niveles de concentración del analito en el rango lineal, reportado por la literatura específica del método de ensayo que se está estandarizando.
- Con estas soluciones y el blanco de reactivos, se realiza una curva de calibración (respuesta vs concentración).
- Realizar 10 lecturas de cada concentración y registrar los resultados mediante una tabla, de tal forma, que se facilite la visualización de los mismos.

- La curva de calibrado se establece siempre con la respuesta del instrumento en el eje vertical (y) y la concentración en el eje horizontal (x).
- Los datos se someten a regresión lineal para obtener la ecuación de cada recta ($y = mx + b$) y se consignan en la tabla los valores para cada caso, correspondientes al coeficiente de correlación lineal (r), pendiente de la curva de calibración (m) y el intercepto de la curva (b).

Coefficiente de correlación-determinación

Para estimar la bondad con que se ajustan los puntos experimentales a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-producto (r). Para simplificar, a este dato estadístico se le denomina “coeficiente de correlación” r , cuyo valor se define según el método, en el diseño experimental respectivo; se estima que como mínimo debe ser de 0,990 para garantizar el ajuste lineal entre las concentraciones y las respuestas obtenidas. Sin embargo este criterio por sí solo no es suficiente para concluir ajuste lineal, se debe realizar un contraste estadístico para confirmar la condición.

Para la interpretación del coeficiente de correlación (r), siempre se debe representar la curva de calibrado, si no es así, se puede deducir erróneamente del cálculo de r , una relación de carácter lineal. En el caso que se encuentren valores de r bajos, será necesario emplear un contraste estadístico adecuado para ver si el coeficiente de correlación es realmente significativo, teniendo en cuenta el número de puntos usados para su cálculo. El método más simple para hacer esto, es calcular un valor de t , usando la siguiente ecuación:

$$t = (|r| * \sqrt{n-2}) / \sqrt{1-r^2}$$

El valor de t calculado se compara con el valor de t tabulado al nivel de significación deseado, utilizando un contraste t de dos colas y $(n-2)$ grados de libertad. Si el valor calculado es mayor que el t tabulado, se concluye que la correlación si es significativa y el ajuste lineal es válido, aún a pesar que el coeficiente de correlación sea menor al aceptado

- Límite de detección y límite de cuantificación

El Límite de Detección es una respuesta estadísticamente diferente de la suministrada por el blanco de reactivos, a un nivel de confianza específico. De otra parte, el Límite de cuantificación corresponde a la menor concentración o concentración de analito en una muestra, que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud, bajo las condiciones experimentales establecidas.

Para realizar el cálculo de estos dos límites se procede así:

Estimación de la desviación estándar del blanco

Se realiza la lectura de mínimo cinco (5) réplicas de blanco de reactivos para estimar la desviación estándar. Se asume razonablemente que la desviación estándar de la respuesta de un método es aproximadamente constante en los rangos de concentración de analito cercanos a cero, por lo cual se asume que en ese rango la desviación estándar es aproximadamente igual a S_B .

Se calcula la desviación estándar del blanco S_B a partir de la siguiente fórmula:

$$S_B = \sqrt{[\sum (L_i - L_B)^2] / (n-1)}$$

Donde

L_i	Señal individual de cada réplica de blanco de reactivos
L_B	Media de L_i
n	Número total de réplicas de blanco de reactivos

Estimación del Límite de Detección

Está definida por la siguiente fórmula:

$$L_D = L_B + (k) (S_D)$$

Donde

L_B	Señal media de los blancos de reactivos
S_D	Desviación estándar de las mediciones a la concentración del analito correspondiente al Límite de detección
k	La selección del valor de k está dada por el nivel de confianza deseado, para concluir que la muestra contiene el analito de interés.

Para la fórmula anterior, generalmente el uso de un $k=3$ es recomendado y corresponde a un nivel de confianza del 99.86%, quedando entonces la fórmula así:

$$L_D = L_B + (3) (S_D)$$

Finalmente si la desviación estándar de las mediciones de la concentración en el Límite de Detección, S_D se asume como aproximadamente igual a S_B , entonces el Límite de detección es tres desviaciones estándar por arriba de la señal del blanco:

$$L_D = L_B + (3) (S_B)$$

Estimación desde los datos de regresión lineal

Cuando se quiere realizar el cálculo del Límite de detección desde una curva de calibración, se aplica la misma fórmula definida anteriormente,

$$L_D = L_B + (3) (S_B)$$

Solo que se reemplazan los siguientes términos:

L_B es decir la señal media de los blancos de reactivo se reemplaza por la ORDENADA AL ORIGEN (a)

S_B es decir la desviación estándar de las lecturas de los blancos de reactivo se reemplaza por el ERROR TÍPICO ($S_{y/x}$)

Posteriormente se reemplaza el valor de señal obtenida en la ecuación de la curva y se halla la concentración correspondiente al Límite de detección.

Estimación del Límite de Cuantificación

- Se calcula con base en la siguiente ecuación:

$$L_C = L_B + (10) (S_B)$$

Este límite también es susceptible de ser calculado desde los datos de regresión, reemplazando los términos L_B y S_B como se definió para el Límite de Detección.

- El límite de cuantificación se puede evaluar también de forma experimental. Se prepararan soluciones de concentraciones cercanas al punto inferior de la curva de calibración. Dichas soluciones serán analizadas mínimo 3 veces. El límite de cuantificación es el valor en el cual el coeficiente de variación no excede el aceptado por el laboratorio para la metodología de análisis evaluada.

- Sensibilidad

Sensibilidad instrumental

La sensibilidad está determinada por el FACTOR DE SENSIBILIDAD, el Límite de Detección y el Límite de Cuantificación del método analítico. El Factor de Sensibilidad corresponde a la relación:

Concentración del analito / Respuesta del equipo

Este factor se calcula para cada punto de la curva de calibración y el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), no deberá ser superior al 5%.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica es una relación entre la sensibilidad instrumental y el ruido instrumental.

$$\gamma = \frac{SEN}{S_y}$$

Donde S_y es una medida conveniente del nivel de ruido en la respuesta.

Para estimar el nivel de ruido pueden usarse dos procedimientos, que en teoría deberían coincidir. En el primero, se estima el ruido instrumental (S) a través de los desvíos de las réplicas de las mediciones de calibrado respecto de sus promedios:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{m - p}}$$

donde p es el número de niveles de concentración estudiados en la recta, r es el número de réplicas de cada punto, y , es el valor de la respuesta correspondiente a cada nivel y réplica, e y_i es el promedio de las respuestas de las réplicas para cada nivel de concentración. En la ecuación, el número de grados de libertad es $n-p$, ya que de los m datos disponibles, p grados de libertad se reservan para el cálculo de las p medias j .

En el segundo método de estimación del nivel de ruido, se determina como el desvío estándar de los residuos de la regresión lineal, el parámetro ya definido $s_{y/x}$. Si los datos estudiados cumplen la relación lineal entre respuesta y concentración, los dos métodos anteriormente descritos deben proveer resultados similares en cuanto a la estimación del ruido instrumental.

- Robustez

Las pruebas de robustez incluyen la aplicación de variaciones deliberadas al método y estudiar el efecto resultante en el desempeño. De esta manera es posible identificar las variables que tiene el efecto más significativo y en base a ello, controlarlas cuidadosamente cuando se aplica el método. Cuando se requiere mejorar el método, las mejoras se pueden realizar sobre aquellas partes que se sabe, son críticas. La robustez por lo general se evalúa durante el desarrollo del método y se enfoca hacia determinar el efecto de las variaciones sobre la precisión y la exactitud del método.

- Identificar las variables que pueden tener un efecto significativo en el desempeño del método.
- Establecer experimentos (analizando materiales de referencia, muestras de composición conocida o materiales de referencia certificados) para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión de variables que se van cambiando sistemáticamente.
- Analizar una vez cada serie de condiciones experimentales.
- Determinar el efecto de cada cambio de condiciones sobre la media.
- Clasificar las variables en orden de mayor a menor efecto sobre el desempeño del método.

En el diseño experimental se debe detallar el esquema de corrida de las muestras para los diferentes parámetros a estudiar, en términos de cantidad, tipo de muestra, días de montaje, entre otros.

Modelo de ejecución

- **Categorías y matrices:** Se debe especificar el tipo de muestras que se van a utilizar en el ejercicio (naturales, Materiales de Referencia primarios o secundarios, estándares internos, controles de kits comerciales, etc.), detallando la identificación que se va a dar a las mismas y en el caso de Materiales de Referencia, toda la información que soporte la vigencia y trazabilidad respectiva, incluidos los certificados de calidad expedidos por el fabricante. Para las muestras naturales que se emplean se debe registrar la identificación de la muestra y los datos que soporten la trazabilidad de la información relacionada con su origen y caracterización. De igual forma, de acuerdo a la naturaleza de las muestras, estas pueden ser categorizadas y seleccionadas (por ejemplo por el método de bloques incompletos) de tal forma que se logre una representatividad de las diferentes matrices allegadas para estudio.
- **Tamaño de muestra:** Debe definirse el tamaño de muestra para el ejercicio, criterio que puede proceder de lineamientos establecidos en publicaciones relacionadas o cálculo estadístico de la misma.

- Obtención de muestras: Se debe declarar la fuente de las muestras y/o materiales de referencia empleados en el ejercicio y la evidencia de que han estado en adecuadas condiciones de almacenamiento.
- Caracterización e identificación de muestras: Se debe detallar la caracterización de las muestras y/o materiales de referencia empleados con evidencia de trazabilidad cuando aplique, así como la identificación que se manejará en el ejercicio, con el fin de tener claridad para el análisis de datos.
- Reactivos: Se deben detallar los reactivos utilizados, especificando lote, vencimiento (si aplica) y los respectivos certificados de calidad.
- Equipos: Se debe realizar un listado de los equipos críticos, detallando su identificación y las especificaciones técnicas e instrumentales de cada uno, según aplique.

1.1.1. Metodología de ejecución

- Fundamento del método de ensayo: Se debe detallar el fundamento del método de ensayo, declarado en el respectivo documento.
- Competencia técnica de los analistas: Se debe presentar de manera resumida la evidencia de competencia técnica del personal analista que participa en el ejercicio.
- Fuente de los datos: La recolección de datos deberá hacerse en todos los casos, en las hojas de trabajo que sirvan como soporte primario al ejercicio, a partir de los cuales se alimenta el formato que se haya diseñado de acuerdo al tipo de análisis y el parámetro a evaluar.
- Presentación de los datos: Se debe describir la metodología de presentación de los datos, tanto primarios como resultados de análisis para que se reflejen en el Informe de Validación.
- Análisis de datos: Se debe aplicar la metodología de cálculo de acuerdo al tipo de ensayo y parámetro a estudiar, análisis de datos anómalos, aplicando los test estadísticos pertinentes al tamaño de las muestras y aplicación de herramientas estadísticas de acuerdo a los planteamientos o hipótesis a comprobar.
- Criterios de aceptación: En este ítem se deben definir las especificaciones de desempeño del método, de tal forma que se tenga el criterio para comparar los datos obtenidos para los diferentes parámetros evaluados en el ejercicio de Validación. Dichos criterios pueden corresponder individualmente o en conjunto a criterios

definidos desde el método de ensayo u objetivos analíticos del laboratorio fundamentados en normatividad vigente y los requisitos del cliente. Cuando dichos criterios no se encuentren documentados, el objetivo del ejercicio será determinarlos.

Informe de validación

El Informe de Validación debe dar respuesta a todos los planteamientos definidos en el diseño experimental. Siendo consecuente con este principio, deberá presentar la información relacionada cada uno de los parámetros definidos en el diseño experimental, registrando según aplique, la evidencia o referencia de la misma, de aspectos tales como trazabilidad, consolidados de comportamiento histórico de equipos (según aplique), intervenciones metrológicas a equipos (último mantenimiento, calibración, calificación o verificaciones), condiciones ambientales relevantes (cuando aplique), entre otros. Adicionalmente el informe debe contener un apartado de conclusiones que presenta la información encontrada fundamentado en los resultados de análisis estadísticos realizados, se definen las conclusiones del estudio, teniendo en cuenta los criterios de aceptación y/o rechazo para las pruebas estadísticas y los lineamientos de los métodos de ensayo para los parámetros específicos.

Revalidación

La revalidación corresponde a la verificación mediante pruebas documentadas de que un método analítico previamente validado, continúa siendo suficientemente fiable en el tiempo o tras realizar modificaciones respecto al método inicial. Se puede requerir en los siguientes casos:

- Paso del tiempo: Para demostrar que el método sigue siendo válido. Típicamente con periodicidad anual se realiza un consolidado de datos obtenidos desde los esquemas de aseguramiento de la calidad y se realiza un re-análisis para robustecer la estimación de los parámetros asociados.
- Cambio en la muestra: Corresponde a la inclusión de nuevas matrices para analizar o modificaciones importantes en la matriz estudiada habitualmente.
- Cambios instrumentales: Cuando se produzcan cambios en los equipos utilizados o en los elementos críticos para su funcionamiento.
- Modificaciones de parámetros analíticos: Cuando se decide realizar alguna modificación en parámetros como tiempos de agitación, proceso de extracción, tiempos de incubación, etc.

Los pasos a seguir son:

- Definir el cambio y documentarlo
- Ver si el cambio está dentro del ámbito de aplicación, parámetros y límites establecidos en el método.
- Determinar el alcance de revalidación a realizar en función del cambio.
- Realizar la validación de los parámetros definidos.

El alcance de revalidación depende de la naturaleza de los cambios realizados. A continuación se presenta un modelo orientativo de aplicación:

CAMBIO	PROPUESTA DE PARÁMETROS A EVALUAR
MATRIZ	Selectividad Exactitud Linealidad y rango Límites de cuantificación y detección
INSTRUMENTAL	Linealidad y rango Precisión Exactitud Límites de cuantificación y detección
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	Linealidad y rango Precisión Exactitud Límites de cuantificación y detección

Referencias

- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN Calidad de agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos. Bogotá. ICONTEC 2003 (GTC 84).
- ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA Validación de métodos analíticos. Barcelona. 2001: Parte I.
- EURACHEM CITAC GUIDE. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Reino Unido. 1998. Primera Edición.
- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Validation of analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Calidad de Métodos analíticos. Capítulo 13. <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S15.htm>
- THE INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY – IUPAC. Compendium of analytical nomenclature http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/AlphaIndex.html
- NATIONAL ASSOCIATION OF TESTING AUTHORITIES – NATA. – Guidelines for the validation and verification of chemical test methods – Technical Note 17 http://www.nata.asn.au/phocadownload/publications/Technical_publications/Technotes_Infoapers/technical_note_17.pdf
- AOAC INTERNATIONAL. ISTA Method Validation for Seed Testing – APPENDIX 5: Instructions for Reviewers: Draft Test Plan www.seedtest.org/.../MVfST_APPENDIX5_InstructionsforReviewers_DraftTestPlan.doc.
- ENTIDAD NACIONAL DE ACREDITACIÓN – ENAC. Guía para la acreditación de laboratorios de análisis microbiológicos <http://www.enac.es/web/enac/documentos-descarga>
- AOAC INTERNATIONAL. Final report and executive summaries from the AOAC International – Presidential Task Force on Best Practices in Microbiological Methodology. 2006.
- COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS. Guía para la evaluación del desempeño de métodos de prueba microbiológicos

<http://www.cofepris.gob.mx/work/sites/cfp/resources/LocalContent/2075/5/cvmb042011.pdf>

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION (APHA), THE AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), AND THE WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 2012. 22th Edition.
- MCDONALD, J.H. Handbook of Biological Statistics
<http://udel.edu/~mcdonald/statintro.html>
- ADVISORY COMMISSION FOR METROLOGY Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Helsinki; 2002.

Elaboró: Luis Carlos Martinez Avila – Profesional Universitario
Subdirección de Gestión de Calidad de LSP

Revisó: Diana Patricia Martinez Hernandez – Profesional Especializado
Subdirección de Gestión de Calidad de LSP

Aprobó: Lynda Patricia Prieto Navarrera – Subdirector Técnico
Subdirección de Gestión de Calidad de LSP