

1. OBJETIVO

Establecer la metodología y los ensayos requeridos para la confirmación o validación de los atributos de los métodos de análisis utilizados en el Laboratorio De Calidad Ambiental del IDEAM (LCA).

2. ALCANCE

Este instructivo inicia con el plan de confirmación para las técnicas analíticas físico-químicas y microbiológicas, contempla los criterios de confianza del método como son: determinación del límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, sensibilidad, precisión, exactitud, porcentaje de recuperación, e incertidumbre, según corresponda. Para la validación de métodos además de los anteriores atributos, se deben realizar ensayos de robustez y selectividad (teniendo en cuenta que estos son atributos adicionales y obligatorios cuando se desea llevar a cabo el proceso de validación). Termina con la entrega del informe final de confirmación o validación.

3. DEFINICIONES


En el presente instructivo se aplican las definiciones de la norma ISO 17000:2005 y del VIM: 2008. Vocabulario internacional de metrología: Conceptos fundamentales y generales y términos asociados.

- **Método normalizado:** métodos publicados por otros organismos, generalmente comunidades científicas, ejemplo, EPA, ASTM, ISO, etc.
 - **Validación:** de acuerdo a la ISO/IEC 17025 es la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.
 - **Confirmación:** la aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados.
 - **Blanco de Reactivos o Blanco de Método (MB):** agua ultra pura que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos solventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra.
 - **Blanco Fortificado de Laboratorio (LFB):** es una muestra de agua de reactivo a la que se ha añadido una concentración conocida del analito de interés. Se utiliza para evaluar el desempeño de laboratorio, y la recuperación del analito en una matriz en blanco.
 - **Muestra (M):** el término se refiere a cada sistema físico que sea sometido al procedimiento de análisis siguiendo el método que se está confirmando o validando, ya sea un blanco, un estándar, una muestra adicionada, o una muestra real propiamente dicha.
 - **Matriz Fortificada de Laboratorio (LFM):** es una muestra natural o real a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito de interés. Esta adición debe realizarse antes de la preparación de la muestra.
 - **Niveles de Detección:** son aquellos que permiten determinar la concentración del analito, presente en la muestra. Actualmente, existen varios tipos de niveles de detección: Límite de detección instrumental (LDI), Límite de detección del método (LDM) y nivel de cuantificación (LCM), cada uno con un propósito. La relación entre ellos es aproximadamente LDI: LLD: LDM: LCM = 1: 2: 4: 10. Ocasionalmente, los analistas usan el LDI como guía para determinar el LDM.
 - **Límite de Detección Instrumental (LDI):** concentración de analito que produce una señal superior a la relación señal/ruido del instrumento.
 - **Límite de Detección del Método (LDM):** concentración de analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco.
 - **Límite de Cuantificación (LCM):** Es la concentración de analito que produce una señal suficientemente más fuerte que el blanco, de modo que se puede detectar con un nivel específico de confiabilidad durante las operaciones de rutina
 - **Linealidad:** es la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento y se debe verificar si en el laboratorio se cumple el intervalo y tipo de linealidad que reporta la literatura del método.
- Nota:** Cuando la señal no es directamente proporcional a la concentración, por ejemplo, al trabajar con pH u otros electrodos de ion selectivo, se requiere una transformación de los valores medidos antes de que se pueda evaluar la linealidad.
- **Intervalo de Linealidad:** hace referencia a la menor y la mayor concentración de analito en la muestra para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

- **Intervalo de Trabajo:** intervalo de concentraciones donde actúa el método en cuestión. Debe estar incluido en el rango lineal.
- **Sensibilidad:** es la variación de la respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente en una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración. Como valor se puede reportar el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de confirmación o validación, indicando su desviación estándar. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.
- **Precisión:** es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, como la desviación estándar (s), y la desviación estándar relativa o Coeficiente de variación (CV).
- **Repetibilidad:** Atributo de precisión. Es la variación más pequeña de los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo, trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos).
- **Reproducibilidad:** Atributo de exactitud, es una medida de la variabilidad, la cual supone dar la mayor variación en los resultados, entre laboratorios. La reproducibilidad se refiere a la variación entre laboratorios utilizando el mismo método, también puede referirse a la variación observada entre laboratorios utilizando diferentes métodos, pero con la intención de medir la misma magnitud.
- **Precisión Intermedia:** es una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad. Las condiciones exactas utilizadas deben establecerse en cada caso. El objetivo es obtener una estimación de la precisión que refleje todas las fuentes de variación que se producirán en un solo laboratorio en condiciones de rutina: diferentes analistas, periodos de tiempo prolongado, diferentes piezas de equipos entre otros.
- **Exactitud:** estimación de qué tan cerca está un valor medido del verdadero valor. La exactitud se estudia como dos componentes: 'veracidad' (sesgo) y 'precisión'.
- **Recuperación:** es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como porcentaje.
- **Robustez:** es una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método.
- **Selectividad Analítica:** es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analito particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.
- **Errores Sistemáticos:** son errores relacionados con la forma en la que se utiliza el instrumento de medida. se caracterizan por una desviación sistemática en relación con el valor verdadero; es decir, todas las medidas individuales son demasiado grandes o demasiado pequeñas. Un error sistemático positivo produce un valor central mayor que el valor verdadero y un error sistemático negativo da lugar a un valor central menor que el valor verdadero. Tanto los errores sistemáticos positivos como los negativos pueden afectar el resultado del análisis, con un efecto acumulativo que conduce a un error sistemático positivo o negativo neto.
- **Incertidumbre:** parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mesurando, a partir de la información que se utiliza.
- **Material Referencia Certificado (MRC):** es aquel que cuenta con un valor de medida certificado y con un documento que demuestra su trazabilidad metrológica y en el que se declara su incertidumbre.
- **Material de Referencia (MR):** cualquier material empleado como valor de referencia, ya sean reactivos de laboratorio de pureza conocida, productos químicos industriales u otros dispositivos. La propiedad o analito debe ser estable y homogénea pero no necesita contar con el alto grado de caracterización, trazabilidad metrológica, incertidumbre y documentación exigida a los MRC.
- **Cepa de Referencia:** un cultivo de microorganismos procedente de una colección reconocida nacional o internacional.
 - **Señal:** relación de ruido.

4. ASPECTOS DE SALUD Y SEGURIDAD LABORAL

Revisar el Manual E-SGI-ST-M001 Sistema de gestión de seguridad y salud en el trabajo y las hojas de seguridad de los reactivos.

 <p>IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales</p>	INSTRUCTIVO DE CONFIRMACIÓN O VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	Código: M-S-LC-1038
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 36 de 16

Utilizar los implementos de seguridad: bata, pantalón, zapatos antideslizantes, gafas de seguridad y tapaboca.

5. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIALES

Los definidos en el desarrollo de actividades de este instructivo.

6. LIMITACIONES E INTERFERENCIAS

No aplica.

6.1. Condiciones ambientales

No aplica.

7. CONTROL Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Es el objeto del instructivo que se desarrolla en el siguiente numeral.

8. DESARROLLO

Para la confirmación y validación de cada método, el analista a cargo de cada metodología debe seguir el procedimiento que se describe a continuación.

Plan de Confirmación o Validación: la etapa preliminar es parte integral y pre-requisito, consiste en una serie de pasos que permiten obtener información relevante y orientar el proceso. Para ello el LCA – IDEAM establece:

Selección del método para cada analito y por cada matriz. Debe contener los criterios de selección correspondientes.

- Creación de un archivo físico (carpeta) para toda la documentación generada en el proceso. La carpeta debe radicarse en el archivo técnico y estar disponible para su consulta permanente.
- Tener y conocer el protocolo del método, disponiendo de una copia de trabajo (debe incluir bibliografía).
- Conocimiento del fundamento físico –químico y microbiológico del método y de la técnica a la cual pertenece éste.
- Inventario de los reactivos que se necesitan para toda la confirmación o validación.
- Inventario de vidriería y otros materiales necesarios, señalando las cantidades necesarias para cada día y requerimientos para su limpieza.
- Verifique si los formatos de captura de datos existentes se adaptan a los requerimientos específicos de la metodología, de lo contrario diseñe y presente un formato para su aprobación, al líder físico-químico.
- Estime el intervalo de aplicación del método, teniendo en cuenta las necesidades del laboratorio, Información de la literatura (protocolo), Interés específico (ambiental), capacidad del equipo en el Laboratorio.
- Diseñar el plan de confirmación o validación en el formato M-S-LC-F060 Plan de Confirmación o Validación de Métodos el cual debe incluir la preparación de reactivos, estándares, muestras y matriz fortificada de acuerdo con el tiempo de vida útil de cada uno y la estabilidad del analito. Este plan deberá ser presentado para revisión previa al Líder técnico o Líder físico-químico.

Se debe tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Si un método normalizado es modificado por el organismo que lo publicó, la confirmación se debe realizar de nuevo, en la extensión necesaria.
- Cuando se hacen cambios a un método validado, se debe determinar la influencia de estos cambios, y cuando se encuentre que estos afectan la validación inicial, se debe realizar una nueva validación del método.
- Cuando hay cambio de instalaciones o de equipos de medición, se debe confirmar o validar nuevamente según se requiera.
- Se debe re validar o re confirmar cada 4 años según las necesidades del laboratorio.

8.1. Parte experimental o de mediciones

A continuación se describen los atributos a verificar en la confirmación y los ensayos a realizar en el orden propuesto. En el caso de las validaciones se deberá extender el estudio hasta la robustez y selectividad del método.

8.1.1. Métodos físico-químicos

- **Límite de detección instrumental (LDI):**

Este parámetro se estima con el procesamiento de diez alícuotas de blancos. Una vez calculada la desviación estándar de la lectura de los anteriores 10 blancos, se aplica el factor 1.645, esto dará como resultado el **LDI**:

$$\text{LDI} = 1.645 * s_{\text{blancos}}$$

Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato Cálculos de Confirmación o Validación de Métodos, hoja de cálculo 1 (LDI).

El LDI no aplica para los métodos volumétricos y potenciométricos de acuerdo a lo establecido en el *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Indicados en la Tabla: 2020 B.

- **Límite de detección del método (LDM):**

Para la determinación del límite de detección del método se puede partir del siguiente cálculo:

$$3,14 * s_{\text{blancos}} * F = \text{LDM estimado}$$

F: Estimación entre 1-5 veces, para el laboratorio se establece F=5

s_{blancos} : desviación estándar de los blancos.

A partir del LDM estimado preparar mínimo 7 soluciones, la realización de los ensayos se distribuye en un periodo de tres días (de dos a tres mediciones diarias). Si lo que se requiere es validar, tener en cuenta por lo menos 10 réplicas. El promedio de las medidas debe cumplir con un porcentaje de error menor o igual al 50% o con lo estipulado en la norma de referencia.

Para obtener el valor final del LDM, calcular la desviación estándar (s) de los siete datos y multiplicar por el valor *t-student*, para los respectivos grados de libertad, en el caso de que se realicen 7 medidas, *t* es igual 3.14. Para 6 grados de libertad en el nivel de confianza del 99%. Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 3 (LDM & LCM). El LDM se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{LDM} = X_{\text{Promedio}} + (t * s)$$

Donde:

s: Desviación estándar de los datos

X_{Promedio} : Promedio de los datos

t : 3,14

Para métodos cromatográficos preparar mínimo 7 soluciones de concentración conocida hasta obtener una señal distinguible de la línea base. En las validaciones tener en cuenta por lo menos 10 réplicas. Verificar si los datos tienen distribución normal (utilizar prueba de Anderson – Darling) y si hay existencia de datos anómalos (utilizar *test* de Grubbs), el criterio de aceptación es el mismo enunciado para los métodos físicoquímicos. Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 2 (Prueba de normalidad).

Nota: Algunos métodos son susceptibles a la determinación del LDM, y estos métodos son considerados en el *Standard methods for the examination of water and wastewater*, Ed. 23. Indicados en la Tabla: 2020: I. Determine el LDM al menos una vez al año para cada analito o parámetro en un método, ver anexo 2.

- **Límite de cuantificación (LCM)**

Preparar mínimo 7 soluciones de concentración conocida (aproximadamente de 2.5 veces el límite de detección del método). Para algunos métodos cromatográficos preparar mínimo 7 soluciones de concentración conocida hasta obtener unas señales repetibles. En la validación tener en cuenta por lo menos 10 réplicas.

Verificar si los datos tienen distribución normal y si hay existencia de datos anómalos, si hay que eliminar máximo un dato. Los resultados de los ensayos deben cumplir con los criterios de porcentaje de coeficiente de variación y porcentaje de error del 10%. Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja 2 y 3. Si este criterio **NO** se cumple, preparar un patrón de concentración un poco más alta y realizar

nuevamente los ensayos y así sucesivamente hasta lograr los niveles aceptados de precisión y exactitud. Cuando se cuenta con datos históricos se debe proceder con la verificación del límite de cuantificación establecido estadísticamente.

- **Linealidad**

Establecer el intervalo lineal preparando una curva de calibración siguiendo lo establecido por el método de referencia o lo recomendado por proveedor, con los datos obtenidos calcular el coeficiente de correlación. La curva de calibración final debe tener por lo menos 5 puntos de calibración sin considerar el blanco, el coeficiente de regresión debe cumplir con lo especificado en la norma de referencia, en los casos no especificados este debe ser ≥ 0.995 en regresiones lineales. Preparar dicha curva de calibración durante tres días, una cada día. Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 4 (Rango lineal).

Evaluar la exactitud de la curva de calibración de la siguiente manera: preparar y analizar un estándar de la misma concentración del primer nivel (límite de cuantificación), al recalcar su concentración con la curva de calibración el error relativo permitido no debe superar el $\pm 50\%$. Preparar y analizar un estándar cuya concentración sea hasta 5 veces la del primer nivel, al recalcar su concentración con la curva de calibración el error relativo permitido no debe superar el $\pm 20\%$. Preparar y analizar un estándar cuya concentración sea mayor a 5 veces la concentración del primer nivel, al recalcar su concentración el error relativo no debe superar $\pm 10\%$. Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 5 (Verificación de curva).

Lo anterior no aplica para métodos volumétricos y gravimétricos.

- **Sensibilidad**

Su valor corresponde al promedio de las pendientes de las curvas de calibración obtenidas en los ensayos de confirmación o validación. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. No aplica para métodos volumétricos y gravimétricos.

- **Intervalo de trabajo**

El intervalo lineal debe estar dentro del intervalo de trabajo. En la verificación se debe preparar una curva con blancos adicionados, realizar todos los procedimientos pertinentes al método (dilución, extracción, concentración, etc.).

El intervalo de trabajo debe ser verificado para cada una de las matrices analizadas. El límite inferior del rango corresponde al límite de cuantificación (LCM) y el límite superior se debe verificar analizando 7 réplicas de una muestra o un estándar que corresponda al 100% del rango, los criterios de aceptación son los mismos utilizados para el LCM. Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 6 (Límite superior).

Nota: La concentración más baja debe ser igual al límite de cuantificación y la concentración más alta .en el extremo superior del rango de calibración. Asegúrese que dentro del rango de calibración se encuentren las concentraciones esperadas o en su defecto las diluciones realizadas, a las muestras analizadas.

Con el fin de evaluar los criterios la precisión, exactitud, porcentaje de recuperación e incertidumbre se deben analizar el siguiente grupo de muestras:

El grupo básico de “muestras” a analizar está constituido por:

BK: Blanco del método.

E.b: Estándar de concentración baja; aproximadamente 2 veces el límite de cuantificación.

E.m: Estándar de concentración media; aprox. El 50% del rango

E.a: Estándar de concentración alta; debe ser aprox. El 90% del rango.


M1: Muestra para ver efectos de la matriz real, cuya concentración sea $<50\%$ del rango

M2: Muestra para ver efectos de la matriz real, cuya concentración sea mucho mayor a la M1.

M1A.b: M1 fortificada con un nivel bajo, máximo el 30% del valor de M1.

M1A.a: M1 fortificada con un nivel alto, mínimo el 50% del valor de M1.

MR: Material de referencia.

 IDEAM Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales	INSTRUCTIVO DE CONFIRMACIÓN O VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	Código: M-S-LC-1038
		Versión : 03
		Fecha: 21/10/2020
		Página: 66 de 16

Del grupo básico de muestras se deben analizar en total 10 conjuntos de muestras en días diferentes, en un periodo mínimo de 5 y máximo de 10 días. Se debe tener en cuenta la estabilidad de analito a evaluar, por ejemplo para métodos de análisis inmediatos con estabilidad no superior a 48 h (véase tabla 1060:I del *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*), analizar los 10 conjuntos en 2 días. El estándar certificado no necesariamente se debe analizar con el grupo de muestras, si no hay cantidad suficiente realizar un triplicado.

Con los resultados de cada grupo de muestras se debe evaluar la distribución normal de los datos y la existencia de datos atípicos, se utilizará la prueba de Anderson y Darling, donde el estadístico p (p -valor) obtenido debe ser mayor a 0,05 (Utilizar el formato M-S-LC-F060 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 2). Los datos atípicos serán estimados con el *test* de Grubbs, máximo se podrá descartar un dato.

Todo el material de vidrio deberá ser lavado previamente de acuerdo con el procedimiento establecido en el laboratorio para cada uso y deberá ser sometido a la revisión o control de calidad correspondiente.

El formato de captura de datos se deberá diligenciar en el mismo momento en que se obtienen los datos (no transcribir, copiar, etc.). Las cifras erradas se deben corregir inmediatamente dejando constancia por parte del analista en forma clara en que consistió el error.

- **Precisión**

Repetibilidad: Se evaluará con el grupo básico de muestras, el coeficiente de variación debe ser $\leq 10\%$, o lo estipulado por la norma de referencia Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 7 (Grupo de muestras).

Precisión intermedia: Se considera la precisión intermedia de los resultados obtenidos por dos analistas. En primer lugar se debe verificar la exactitud de los analistas realizando el análisis de un duplicado de un estándar de referencia. Si la cuantificación del analito se determina por curva de calibración el analista 2 debe, preparar una curva de calibración y analizar 10 veces la muestra M1 del grupo básico de muestras. El análisis que debe realizar el analista 2 debe ejecutarse en diferente día al del analista 1. Evaluar si los datos obtenidos tienen distribución normal y si hay existencia de datos atípicos (Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 8 (Precisión intermedia), luego evaluar si los dos analistas presentan diferencias significativas a través de un análisis de varianza de un factor (ANOVA). Active la herramienta estadística de Excel siguiendo la ruta: archivo/opciones/complementos/ir/activar la opción herramientas para análisis/aceptar. Calcular la ANOVA en la siguiente ruta: datos/análisis de datos/análisis de varianza de un factor/aceptar/seleccionar datos/aceptar. El criterio para determinar que el analista 1 y el analista 2 no poseen diferencias significativas es que el valor de F obtenido sea menor al valor crítico.

Nota: La muestra analizada debe ser la misma utilizada por el analista 1 y su concentración mayor o igual al límite de cuantificación establecido.

- **Exactitud:**

Error relativo: Se evaluará con los estándares que se encuentran en el grupo básico de muestras, el criterio de aceptación es el error relativo $\leq 10\%$ o lo estipulado por la norma de referencia. Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 7 (Grupo de muestras).

- **Porcentaje de recuperación:**

Se calculara para la matriz fortificada en cada nivel de concentración adicionado. El criterio de aceptación es lo estipulado por la norma de referencia. Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 7 (Grupo de muestras).

En caso de métodos analíticos desarrollados por el laboratorio, no normalizados o que deban ser modificados por alguna razón, adicionalmente se deben verificar los siguientes atributos:

- **Selectividad:**

Se debe evaluar la capacidad del método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz bajo las condiciones de prueba establecidos.

Para su determinación, realizar un ensayo por triplicado para calcular el porcentaje de recuperación con un blanco de matriz fortificado y comparar el resultado con el obtenido del análisis por triplicado de un blanco de matriz fortificado que tenga posibles interferencias. En métodos cromatográficos, verificar que en el mismo tiempo de retención, no existe respuesta similares a las del analito.

• **Robustez:**

Para evaluar la robustez se sigue el procedimiento propuesto en la tabla de Youden y Steiner, donde se realizan ocho (8) ensayos a siete (7) factores o variables. Los ocho (8) ensayos se analizan básicamente según el procedimiento de operación del método. Las letras A, B, C..., G indican el valor de la variable sin modificación y las letras a, b, c..., g indican la variable modificada, presencia o ausencia de un factor, u otras condiciones a investigar. Los resultados encontrados se representan mediante las letras s a la z. A continuación se presenta la **Tabla 1** Utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos, hoja de cálculo 9 (Robustez).

Tabla 1. Estudio de robustez diseño para analizar 4 factores

ENSAYO	EXPERIMENTO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	B	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	D	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	F	F	F	f	f	F
G, g	G	f	G	G	g	G	G	g
RESULTADO	s	t	U	v	w	x	Y	z

A partir de los resultados se puede calcular el efecto de cada una de las variables haciendo la media de los cuatro (4) análisis que contienen la variable en su valor más alto (mayúsculas) y aquellas que corresponden al valor más bajo (minúsculas).

Al establecer las siete (7) comparaciones posibles (A –a,...G – g) se puede conocer el efecto que tiene cada variable: a mayor diferencia, mayor influencia de la variable sobre el método analítico. Estas variables deben recibir especial atención a la hora de redactar el método, haciendo énfasis en un control estricto para conseguir resultados de calidad.

8.1.2 Métodos Microbiológicos

Métodos Cuantitativos:

La confirmación o validación de un método relacionado con determinaciones numéricas (p. ej., recuento por unidad, volumen) implica determinar las características de rendimiento del método como se indicó anteriormente, además de lo siguiente:

- **Exactitud:** este indicador nota el grado de acuerdo o falta de incertidumbre, entre lo observado y los valores verdaderos. Es estimará por el uso de cultivos de referencia comparado al nuevo método, esto es llamado porcentaje de recuperación.
- **Precisión/repetibilidad:** es el grado de acuerdo entre las réplicas de los análisis o mediciones bajo las mismas condiciones. Usar un microorganismo específico o la densidad de un grupo microbiano que al menos sea el 75% positivo, pudiéndose detectar suficientes respuestas. El criterio de aceptación es el coeficiente de variación $\leq 5\%$.
- **Precisión/reproducibilidad:** la prueba se desarrolla en dos días. En el día 1 dos analistas deben realizar el análisis de una muestra en condiciones semejantes, en el día 2, los mismos analistas ejecutan el ensayo bajo condiciones diferentes. El criterio de aceptación es el coeficiente de variación $\leq 10\%$.

- **Recuperación/Sensibilidad:** capacidad del método para detectar al microorganismo de estudio o un componente de la misma matriz de estudio. Determinado por el análisis de suficientes muestras utilizando al menos 2 adiciones de suspensiones del microorganismo objeto o aumentando o disminuyendo el volumen de la muestra o dilución analizada, seguido de un análisis estadístico confiable.
- **Límite de detección:** este indicador muestra la densidad más baja del microorganismo que puede ser determinada. Se determina usando diluciones de los cultivos de referencia y midiendo la recuperación entre réplicas de cada dilución. Se especifica en cada método de referencia. Se aplica generalmente a métodos cualitativos. Su estimación deberá realizarse sobre muestras naturales con carga baja del microorganismo a estudiar o, en su defecto, con muestras inoculadas preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente.
- **Límite de cuantificación:** puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se aplica a métodos cuantitativos.
- **Límite superior:** este indicador revela el nivel en cuyas mediciones cuantitativas no llegan a ser confiables (sobrepoblación de colonias típicas y atípicas). Se especifica en cada método de referencia.
- **Rango:** indica el intervalo entre el límite de detección y límite superior.

Métodos Cualitativos:

Se establecen para validaciones de métodos de presencia o ausencia, con las siguientes características:

- Exactitud y precisión
- Especificidad y selectividad
- Límite de detección
- Robustez

Es necesario realizar un control microbiológico de ambientes y superficies, control de cepas de referencia y medios de cultivo, cada vez que se realicen análisis para verificar la adecuada limpieza y desinfección.

8.2. Cálculos y Resultados

Describa los cálculos realizados para obtener los resultados. Incluya información sobre las unidades en las que se deben expresar los resultados y otras cantidades; la ecuación utilizada para el cálculo; el significado de los símbolos algebraicos que aparecen en la ecuación; el número de cifras decimales o de cifras significativas con las que se debe expresar el resultado. Para realizar los cálculos, utilizar el formato M-S-LC-F061 Formato cálculos de confirmación o validación de métodos.

Prueba de Normalidad

Para determinar si los datos obtenidos siguen una distribución normal para una prueba t aplicar la prueba de Anderson – Darling. Las hipótesis de la prueba son:

H_0 : Los datos siguen una distribución normal.

H_1 : Los datos no siguen una distribución normal.

Para obtener el p-valor hacer uso de la hoja de cálculo. Si el estadístico p obtenido (p-valor) es menor que el valor de significancia elegido, normalmente 0,05, se concluye que la distribución de los datos no es normal, dado el caso se debe eliminar datos o repetir análisis hasta obtener datos con distribución normal.

Rechazo de Datos.

Si los datos presentan distribución normal se procede a realizar el análisis para el rechazo de datos, para este propósito se empleará el *test* de Grubbs, la prueba está diseñada para detectar un único valor atípico. La prueba se realiza para verificar si el valor más pequeño o más grande de los datos es un valor atípico, si el dato es atípico el valor G obtenido del cálculo es menor al valor crítico G dado para el número de medidas. El valor G se calcula como sigue:

$$G = \frac{x_n - x_{prom}}{s}$$

Donde, x es el dato sospecho (máximo o mínimo), x_{prom} es el promedio de los valores y s es la desviación estándar. El valor obtenido es comparado con el valor crítico (**Tabla 2**)

Tabla 2. Tabla de valores críticos del test de Grubbs al 98,5% de confianza

Valores críticos de G	
Tamaño Muestra	Valor Crítico
2	1
3	1,15
4	1,48
5	1,71
6	1,89
7	2,02
8	2,13
9	2,22
10	2,29

Límite de detección instrumental (LDI):

$$1.645 * s_{\text{Blancos}} = \text{LDI}$$

s = Desviación estándar del nivel de ruido o señal de fondo, (señal de blanco).

Límite de Detección Método (LDM):

Nivel de detección verdadero estimado.

Seleccione la concentración que se utilizara de la siguiente manera, multiplique la 3,14 por la desviación de los blancos y a esa estimación multiplique máximo por 5, esa estimación puede estar entre: 1 máximo 5.

$$3,14 * s_{\text{Blancos}} * F = \text{LDM ESTIMADO}$$

F = (Estimación entre 1-5 veces)

s_{Blancos} = Desviación estándar de los blancos.

Para obtener el límite de detección definitivo del método, se procede a realizar el siguiente cálculo:

$$\text{LDM} = X_{\text{Promedio}} + (t * s)$$

X_{Promedio} = Promedio de medidas del estándar de concentración conocida

$t = 3,14$, valor de t de Student para 7 datos

s = desviación estándar de las medidas de los 7 estándares de concentración conocida

Precisión: Determinar en porcentaje de coeficiente de variación. La evaluación de la precisión requiere la realización de mediciones repetidas en materiales adecuados. Los materiales deben ser representativos de las muestras de ensayo en términos de la matriz y la concentración de analito, la homogeneidad y la estabilidad, pero no necesitan ser MRC.

$$\frac{s}{x} * 100 = \text{porcentaje coeficiente de variación}$$

x = Promedio de los resultados determinados experimentalmente,

s = Desviación estándar.

Exactitud: En términos relativos en porcentaje.

$$\frac{(x - x_{\text{ref}})}{x_{\text{ref}}} * 100 = \text{porcentaje de error relativo}$$

x = Promedio de los resultados determinados experimentalmente,

x_{ref} = Valor verdadero.

En la determinación de la exactitud se establecerá que no hay un sesgo significativo en relación con los resultados generados por el método existente. El sesgo del método surge de los **errores sistemáticos** inherentes a éste. El sesgo del laboratorio surge de errores sistemáticos adicionales específicos del laboratorio y la interpretación que éste hace del método.

Calcular para cada estándar y para el patrón certificado el porcentaje de error relativo en cada determinación. Determinar para cada tipo de "muestra" el valor de error relativo.

Porcentaje de Recuperación

$$\left[\frac{LFM \times (A + B) - (C \times D)}{E \times A} \right] \times 100$$

LFM = Concentración de la matriz fortificada

A = Alícuota adicionada del patrón (Spike vol)

B = Volumen de muestra (Sample vol)

C = Concentración muestra sin fortificar (sample conc)

D = Volumen total matriz fortificada

E = Concentración del patrón (Spike slution conc)

Nota: el volumen adicionado NO debe aumentar el volumen de la muestra en más del 5%.

Robustez: El efecto absoluto (sesgo) de cada factor A a G de la prueba de Youden y Sneider se puede calcular como sigue:

$$\frac{(s+t+u+v)}{4} = \frac{4A}{4} = A \quad \text{y} \quad \frac{(w+x+y+z)}{4} = \frac{4a}{4} = a$$

La media de los resultados (s + t + u + v) equivalen a "A" porque las seis (6) restantes variables presentes en estos cuatro (4) resultados se anulan ente sí como consecuencia de que existen siempre dos (29 mayúsculas y dos (2) minúsculas de cada variable. Análogamente, la media de los resultados (w, x, y y z) equivalen a "a". Al comparar estos dos valores medios conocemos la influencia de la variable en estudio. Para cualquier otra variable se procede de igual manera.

Incertidumbre: Utilizando la desviación estándar y la incertidumbre asociada a los equipos de medición realizar la estimación de la incertidumbre según lo indicado en el instructivo M-S-LC-1049.

Manejo de Datos Microbiológicos

- Distribución de poblaciones bacterianas:
- Los datos microbiológicos pueden tener amplios rangos de incertidumbre debido a que las muestras no son homogéneas y las características de las bacterias son variables. La distribución microbiana no es necesariamente simétrica y rara vez se ajustan a una curva de distribución normal.
- la distribución del microorganismo en una muestra puede ser natural y exclusiva para una muestra y matriz.
- En el recuento puede encontrarse más de una célula bacteriana o fúngica.
- Los recuentos dependen también del medio, condiciones de incubación, potencial de crecimiento.
- Los datos deben ser convertidos a log decimales, para tener una distribución más simétrica.
- Distribución de Poisson.
- Medidas de tendencia central de distribución sesgada: Poisson indica la probabilidad de observar el organismo de interés; Media geométrica: el número más probable de un microorganismo en una muestra.

8.3. Elaboración y presentación de documentos – informe

El responsable de la confirmación o validación debe presentar los siguientes documentos:

- Plan de confirmación o validación de métodos: formato donde se debe incluir la preparación de reactivos, estándares, muestras y matriz fortificadas de acuerdo con el tiempo de vida útil de cada uno y la estabilidad del analito. Este plan deberá ser presentado para revisión previa al líder técnico o líder físico-químico.
- Informe de confirmación o validación: es una descripción breve de todo el proceso de confirmación o validación realizado y que debe contener los siguientes numerales: fecha de ensayo, referencia del método empleado;

objetivo, metodología (reactivos, equipos, materiales, condiciones de trabajo, procedimiento), análisis estadístico de los resultados, Incertidumbre, conclusiones y cuadro de parámetros de confirmación o validación. Utilizar el formato M-S-LC-F066 Informe de confirmación o validación. Entregar en medio impreso y magnético. El cálculo de la incertidumbre se debe reportar respectivamente siguiendo el instructivo de determinación de la incertidumbre vigente.

- Carpeta de soporte técnico: contiene todos los documentos originales producidos durante el proceso de confirmación o validación, las notas y observaciones del analista, hojas de captura de datos, cálculos, y demás información que permita la revisión del proceso o su replicación por otro analista o por otro laboratorio. Estos documentos deben ser almacenados en orden cronológico.
- Instructivo de ensayo: con los datos de la validación incluidos y las modificaciones y precisiones que se hayan incluido al método original, generar el instructivo de ensayo
- Parámetros de confirmación o validación: corresponde al cuadro parámetros de confirmación o validación del método en medio impreso y magnético. Si alguno de los parámetros no aplica, digite en la casilla la sigla N.A

9. DIAGRAMA DE FLUJO

Ver anexo 1.

10. DOCUMENTOS DE REFERENCIA Y BIBLIOGRAFIA

Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025

American Public Health Association (APHA). Standard Methods of Water and Wastewater. 23 ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation publication. APHA, 2017, Washington D.C.

Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Consultado en marzo del 2018, disponible en www.eurachem.org”.

“Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: la adecuación al uso de los métodos analíticos – una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Consultado 2018 en <<www.eurachem.org>>”.

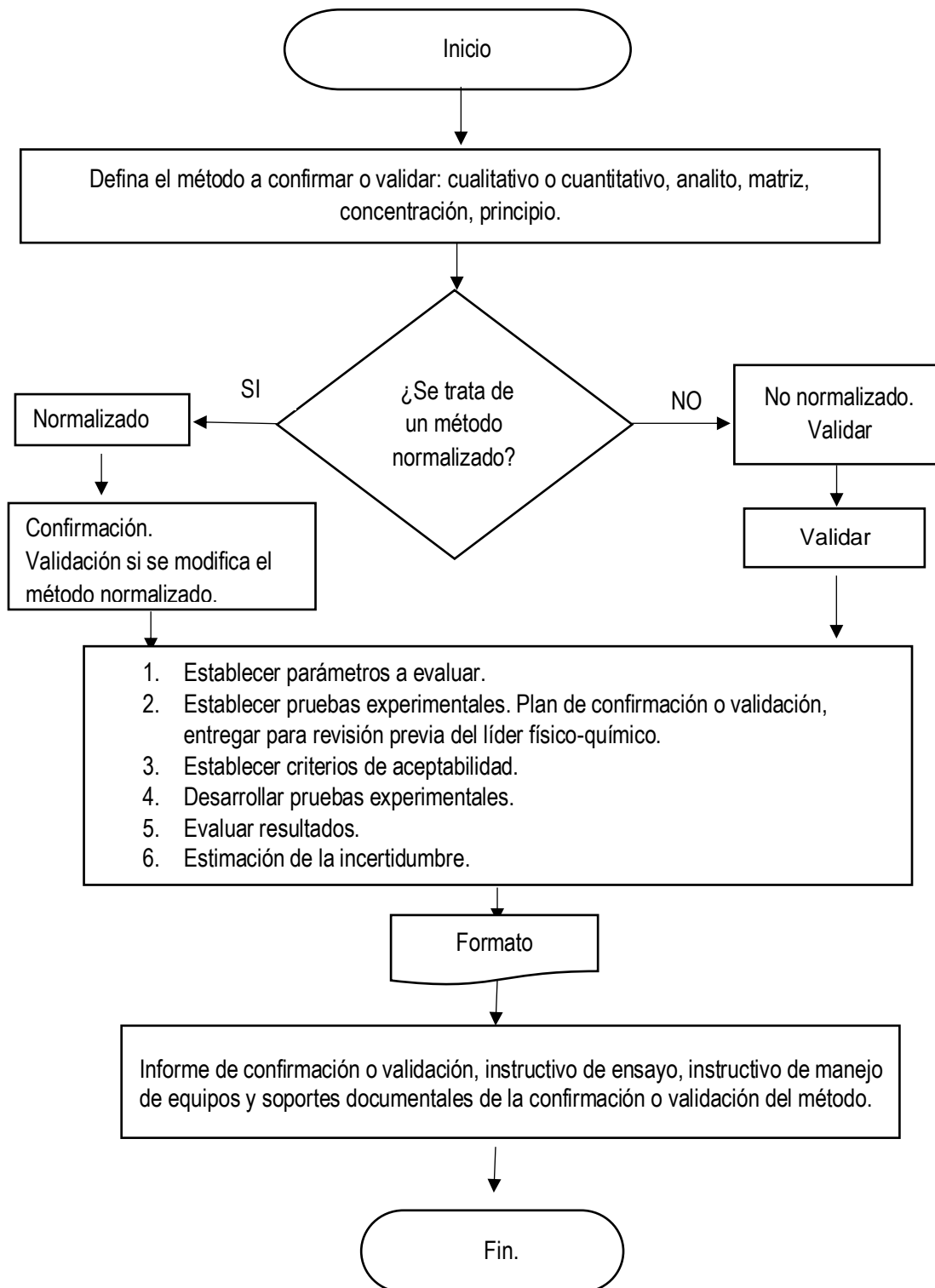
Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos Generales sobre la Validación de Métodos”. Santiago, 2010. Consultado en marzo del 2018, disponible en: <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_metodos.pdf>>”.

11. HISTORIAL DE CAMBIOS

VERSIÓN	FECHA	DESCRIPCIÓN
01	23/05/2018	Creación del documento con base a la nueva estructura del SGI.
02	24/09/2019	Se incluye las recomendaciones para la revalidación y reconfirmación en el numeral 5
03	21/10/2020	Nueva versión producto de la actualización de la documentación del Sistema Integrado de Gestión.

ELABORÓ: Analistas de Laboratorio Contratistas Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	REVISÓ: Carlos Martín Velásquez Ramírez Contratista Líder Técnico Grupo Laboratorio de Calidad Ambiental	APROBÓ: Nelson Omar Vargas Martínez Subdirector de Hidrología
---	--	--

ANEXO 1. Diagrama



Anexo 2. Métodos susceptibles a la determinación del LDM. Standard Methods for the Examination of water and wastewater.

QUALITY ASSURANCE/QUALITY CONTROL (2020)/Quality Control Practices					
TABLE 2020-1. METHODS IN PART 2000 INDICATING OR AMENABLE TO INITIAL QUALITY CONTROL					
	Section	Bias	Precision	MDL	Operational Range
2120B	Color	-	X	-	-
2120C		-	X	X	-
2120D		-	X	X	-
2120E		-	X	X	-
2120F		-	X	X	-
2130B		Turbidity	-	-	X
2170B	Flavor Profile Analysis	-	X	-	-
2310B	Acidity	-	X	-	-
2320B	Alkalinity	X	X	-	-
2340C	Hardness	X	X	-	-
2350B	Oxidant Demand/Requirement	-	-	X	-
2350C		-	-	X	-
2350D		-	-	X	-
2350E		-	-	X	-
2510B	Conductivity	-	X	-	-
2520B	Salinity	-	X	-	X
2520C		-	X	-	-
2530C	Floatables	X	X	X	-
2540B	Solids	-	X	-	-
2540C		-	X	-	-
2540D		-	X	-	-
2540E		-	X	-	-
2560B		Particle Counting and Size Distribution	-	X	X
2560C	-		X	X	-
2560D	-		X	X	-
2570B	Asbestos	X	X	-	-
2580B	Oxidation-Reduction Potential	X	X	-	-
2710G	Tests on Sludges	-	X	-	-
2710H		-	X	-	-
2720B	Anaerobic Sludge Digester Gas Analysis	X	X	-	-
2720C		X	X	X	-
2810B	Dissolved Gas Supersaturation	X	X	-	-

Anexo 3. Valores de la distribución t (99%) para calcular LDM

Grados de libertad	99% de confianza
1	31,82
2	6,96
3	4,54
4	3,75
5	3,36
6	3,14
7	3,00
8	2,9
9	2,82
10	2,76
11	2,72
12	2,68
13	2,65
14	2,62
15	2,60