

ESTRATEGIAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE DISEÑOS EXPERIMENTALES DE VALIDACIÓN VERSIÓN 01

Lineamiento No. 1 SGCLSP 2016

Subdirección de Gestión de Calidad de los Laboratorios de Salud Pública
Dirección de Redes en Salud Pública
Instituto Nacional de Salud

Elaborado por: Jeannette Cristina Forero
Revisado por: Diana Patricia Martínez, Esther Cristina Barros
Aprobado por: Angela Coronado

2016-05-27

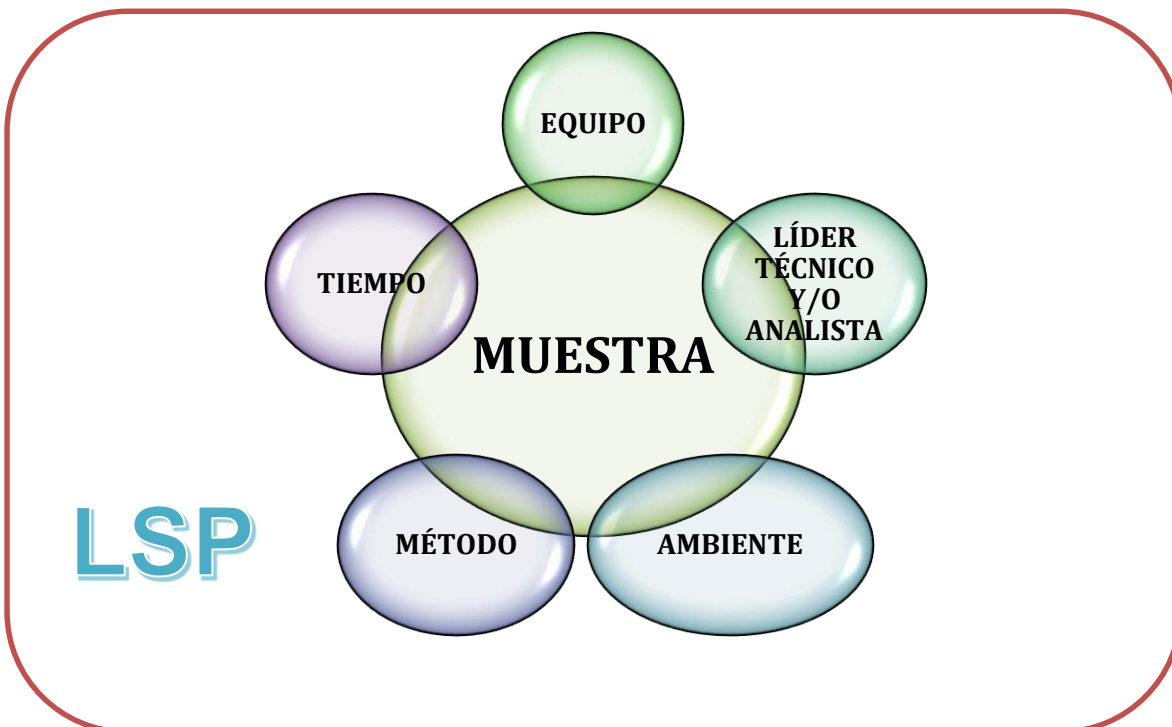
LINEAMIENTO TÉCNICO PARA LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA ESTRATEGIAS PARA LA CONSTRUCCIÓN DE DISEÑOS EXPERIMENTALES DE VALIDACIÓN - VERSIÓN 01

1. INTRODUCCIÓN

“No existe un procedimiento único de validación aplicable a todas las circunstancias. Así, diferentes aplicaciones pueden exigir diferentes énfasis o prioridades. De la misma manera que un rompecabezas puede ser descifrado aún sin haberlo armado en su totalidad, un estudio de validación, también, aún siendo parcial nos puede dar una cabal idea de la calidad del método analítico en estudio” (2)

Hemos tomado este párrafo como el punto de partida más coherente con el objetivo del presente lineamiento, el cual pretende orientar a los Laboratorios de Salud Pública en la construcción de los diseños experimentales aplicables para realizar la validación de los métodos de ensayo que ejecuta, en cumplimiento de su misionalidad como Laboratorios Departamentales de Referencia en el marco del Sistema de Vigilancia en Salud Pública.

La validación de un método analítico es un ejercicio que todo laboratorio debe desarrollar, con el fin de demostrar de manera general que los métodos adoptados se comportan según el uso previsto o las especificaciones definidas cuando se ejecuta en el marco de su sistema de medición particular:



La estructuración cuidadosa del diseño experimental de la validación independientemente de la naturaleza y alcance del método de ensayo, permite desarrollar un ejercicio racional operativa y económicamente guardando el equilibrio costo-beneficio necesario para su ejecución, asegurando así la confiabilidad del resultado.

2. OBJETIVO DEL LINEAMIENTO

Brindar elementos de juicio y toma de decisión, orientados a la estructuración pertinente de diseños experimentales de validación, con el fin de que los Laboratorios de Salud Pública desarrollen sus ejercicios de manera adecuada y suficiente para asegurar la calidad de los resultados analíticos emitidos.

3. ALCANCE DEL LINEAMIENTO

Los ensayos adoptados y ejecutados en los Laboratorios de Salud Pública en el marco del Sistema de Vigilancia en Salud Pública.

4. DEFINICIONES APLICABLES AL LINEAMIENTO

Las definiciones aplicables corresponden a las detalladas en el documento **LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO**, publicado por la Subdirección de Gestión de Calidad de Laboratorios de Salud Pública en 2015.

Adicionalmente se registran otras definiciones a tener en cuenta:

- **Ítem de ensayo:** Corresponde a la denominación que asigna la Norma NTC-ISO/IEC 17025 para las muestras (biológicas, ambientales, alimentos, material entomológico) que se analizan en el marco de la ejecución de los ensayos [Adaptado de Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories ILAC-G18:04/2010].
- **Documento normativo:** Corresponde al documento de referencia y su fecha de edición o versión, que describe los pasos para desarrollar el ensayo. Puede ser una norma nacional o internacional o un documento no normalizado (por ejemplo: los métodos que diseña o desarrolla el OEC, métodos especificados por el fabricante del equipo). [Formulario solicitud de acreditación – Organismo Nacional de Acreditación de Colombia ONAC – Versión 11]

Se debe tener en cuenta las recomendaciones y/o ajustes que puedan ser emitidas por el ONAC en el marco de los ensayos en proceso de acreditación o ya acreditados.

5. ASPECTOS A CONSIDERAR EN LA CONSTRUCCIÓN DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL DE VALIDACIÓN

A continuación, iremos desarrollando cada uno de los aspectos contemplados en la estructuración de un diseño experimental de validación, según lo detallado en el documento **LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO**,

publicado por la Subdirección de Gestión de Calidad de Laboratorios de Salud Pública en 2015, con el fin de aterrizar a escenarios reales y prácticos los elementos de juicio a tener en cuenta para la toma de decisiones respecto al diseño.

En todos los casos para desarrollar un ejercicio de validación, se debe partir de la base de los siguientes aspectos técnicos:

- El método de ensayo debe estar debidamente desafiado en su ejecución por parte del laboratorio: Esto implica que el método se conoce plenamente en cuanto a la naturaleza del método de ensayo, los pasos de ejecución, fundamentación técnica, naturaleza y comportamiento básico (repetibilidad/precisión intermedia/ exactitud (cuando aplica).
- Idealmente se debe haber realizado un ejercicio de estandarización, entendido como aquel que se lleva a cabo de manera simplificada permitiendo asegurar que los resultados obtenidos son precisos y exactos (cuando aplica), obteniendo evidencia objetiva (datos analizados y consolidados en un informe de estandarización) del desempeño del método.
- Se debe tener certeza de que el sistema de medición se encuentra bajo control, es decir, que contamos con instalaciones y condiciones ambientales caracterizadas, equipos controlados metrológicamente, Líder técnico y/o analistas con la competencia técnica requerida, método controlado y que hay disponibilidad de ítems de ensayo (materiales de referencia certificados, materiales de referencia y muestras rutinarias) en número y volumen suficientes con las características de homogeneidad y estabilidad necesarias para el ejercicio.

En algunos casos no cumplimos estrictamente los aspectos señalados anteriormente, es por ello, que la construcción previa y detallada del diseño experimental permite identificar las problemáticas reales en nuestro laboratorio y definir estrategias para subsanar tales dificultades, garantizando un control total del sistema de medición previo al inicio del ejercicio de validación.

La metodología de construcción toma como punto de partida las recomendaciones emanadas de la Subdirección de Gestión de Calidad de Laboratorios de Salud Pública en 2015 a través del documento **LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO**, desarrollando de manera práctica cada aspecto relacionado.

5.1. 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”. (1)

En este aspecto se deben tener en cuenta los siguientes aspectos:

- **Tipo de validación a realizar:** Retomando las definiciones de validación declaradas en la literatura y por ende en el documento **LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO**, podemos concretar el tipo de ejercicio de validación a desarrollar de acuerdo a los siguientes criterios:

TIPO DE MÉTODO	MARCO CONCEPTUAL	APLICABILIDAD EN EL LSP	TIPO DE EJERCICIO DE VALIDACIÓN APLICABLE
NORMALIZADO	Son desarrollados por un organismo de normalización u otra organización reconocida cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico en cuestión. (3)	Básicamente corresponden a los ensayos cuya fuente (documento normativo que declara como se realiza el ensayo) se encuentra en las normas ISO (ensayos alimentos), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (ensayos aguas), Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (ensayos clínicos)	Validación secundaria también denominada Verificación
NO NORMALIZADOS	Pueden haber sido desarrollados por el propio laboratorio u otras partes o haber sido adaptados de métodos normalizados y validados. (3) Los métodos que diseña o desarrolla el OEC, métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, modificaciones de los métodos normalizados o métodos especificados por el fabricante del equipo. [Formulario solicitud de acreditación – Organismo Nacional de Acreditación de Colombia ONAC – Versión 11]	Método normalizado modificado: Serán aquellos métodos normalizados con variaciones de mayor o menor relevancia (cambios en su ejecución, utilización fuera de su alcance, etc.)	Validación con un grado de desarrollo que permita asegurar que los parámetros de funcionamiento obtenidos responden a los criterios establecidos en función de las necesidades de los clientes y que son adecuados al uso previsto Típicamente se debe incluir evaluación de “robustez” del método frente al cambio deliberado que se ha introducido (modificación)
NO NORMALIZADOS	Pueden haber sido desarrollados por el propio laboratorio u otras partes o haber sido adaptados de métodos normalizados y validados. (3) Los métodos que diseña o desarrolla el OEC, métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, modificaciones de los métodos normalizados o métodos especificados por el fabricante del equipo. [Formulario solicitud de acreditación – Organismo Nacional de Acreditación de Colombia ONAC – Versión 11]	Método del fabricante: Típicamente en un LSP estos métodos corresponden a los métodos del fabricante (estuches comerciales para ELISA, VDRL, RPR, métodos comerciales para identificación de microorganismos, etc.)	Validación secundaria también denominada Verificación La verificación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo o del campo de aplicación dados, con base en la disponibilidad de información de la validación primaria desarrollada por el fabricante o el aval que organizaciones internacionales otorguen reconocimiento al método (por ejemplo referencia del método sustrato definido Colilert en el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater para ensayos microbiológicos en aguas)
		Método desarrollado por el laboratorio: Este escenario típicamente no se encuentra en un LSP, sin embargo a efectos prácticos si se adoptara, implicará el desarrollo integral de un ejercicio de validación que permita demostrar la aptitud para el uso previsto	Validación primaria

- **Método de ensayo/analito target a validar:** Se debe declarar el método de ensayo con su nombre completo, es decir incluyendo la siguiente información, la cual se alinea con los requerimientos del ente acreditador Organismo Nacional de Acreditación de Colombia – ONAC para definir el alcance de acreditación [Formulario solicitud de acreditación – Organismo Nacional de Acreditación de Colombia ONAC – Versión 11]; si bien la fuente y exigencia es específica en el escenario de acreditación, este esquema se ajusta al deber ser, en la definición de cualquier método de ensayo:
 - OBJETIVO DEL ENSAYO: Determinación, identificación, detección, recuento etc. (Por ejemplo Determinación de pH, Identificación de *Salmonella* spp, Determinación de anticuerpos, anti-*Trypanosoma cruzi*, etc.).
 - ANALITO: Por ejemplo anticuerpos IgM, anticuerpos IgG, recuento de colonias, pH, etc.
 - MATRIZ: Suero, agua para consumo humano, alimentos, etc.
 - MÉTODO DE ENSAYO: Se debe indicar el método analítico aplicado en el ensayo (gravimétrico, electrométrico, titulométrico, Enzimoinmunoensayo indirecto, etc.).

A manera orientativa se presenta un esquema mediante el cual se puede presentar el objetivo del diseño:

Ejercicio a desarrollar	Validación secundaria (Verificación)	Validación de modificación de un método normalizado	Re-validación del método
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tipo de método	Normalizado <input type="checkbox"/>	Normalizado modificado <input type="checkbox"/>	NO Normalizado (del fabricante) <input type="checkbox"/>
		Detalle de la modificación	
Ensayo			
Documento normativo/año			
Código método de ensayo			

5.2. Alcance

Se debe definir en forma clara el alcance del ejercicio, lo cual incluye el microorganismo target y las matrices sobre las cuales aplica. (1)

En este aspecto se debe declarar con detalle el analito target (microorganismo, anticuerpo, antígeno) cuya identificación, detección, recuento corresponde al método de ensayo a validar/verificar. De igual forma se deben registrar los diferentes tipos de matrices aplicables al método.

Lo anterior se debe hacer en coherencia con el “uso” del método de ensayo en el LSP; por ejemplo si para un método determinado se puede utilizar suero, plasma, sangre total y en el laboratorio sólo se aplica sobre suero, esta última matriz será la que se registre en el alcance del ejercicio de

validación; esto permite adecuar el alcance a la operatividad y aplicabilidad real en el laboratorio y elimina un posible “sobredimensionamiento” del mismo, lo cual afectaría el equilibrio costo-beneficio. Si posterior a la validación/verificación se determina que es necesario ampliar el alcance en cuanto a matrices, se diseñará y realizará el respectivo ejercicio para dar la cobertura requerida.

5.3. Responsables

“Relación del personal responsable de llevar a cabo el ejercicio (Líder técnico y/o analistas) y de los que revisarán y aprobarán los resultados del mismo”. (1)

Aquí se deben determinar los roles/cargos claves del sistema de gestión de calidad que tendrán la autoridad/responsabilidad para asegurar un adecuado desarrollo del ejercicio; en términos generales puede corresponder a:

- **Coordinador LSP:** Su responsabilidad y autoridad debe estar encaminada para gestionar los recursos requeridos para llevar a cabo el ejercicio de validación/verificación. De igual forma, típicamente es responsable de la revisión final y emisión del Informe de validación.
- **Responsable Técnico de área, Líder Técnico:** Su responsabilidad se orienta a tener el conocimiento y capacidad técnica para estructurar el diseño experimental del ejercicio de validación/verificación, contando con la interacción de los Líder técnico y/o analistas según su competencia. De igual forma son responsables de realizar el análisis de los resultados, a fin de presentarlos al Coordinador del LSP.
- **Líder Técnico y/o analistas (según se denominen los roles en el sistema de gestión de calidad del LSP):** Son responsables de la ejecución de los ensayos en el marco del ejercicio de validación/verificación, con el fin de presentar los respectivos resultados al Responsable Técnico de área e interactuar en el análisis de datos.

Es claro que en algunos casos y de acuerdo a la organización interna del LSP, algunos roles pueden ser responsabilidad de un mismo funcionario/contratista; sin embargo es importante entender que a efectos de responsabilidades, estas son independientes y deberán ser asumidas por el o los designados con la rigurosidad establecida, dando respuesta pertinente a las actividades requeridas.

5.4. Parámetros a estudiar – Herramientas estadísticas para análisis

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. (1)

Este aspecto debe ser estructurado sobre la base de un conocimiento amplio y profundo de la naturaleza y la metodología de ejecución del ensayo; a continuación se presentan algunos criterios de decisión, pero se debe tener en cuenta que cada método guarda semejanzas y diferencias con otros y debe evaluarse exhaustivamente las necesidades de evaluación de sus características de desempeño, todo ello a partir del concepto de SISTEMA DE MEDICIÓN presentado previamente en este documento.

De igual forma, es relevante consultar los esquemas específicos de abordaje para cada parámetro aplicable en el documento **LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA ESTANDARIZACIÓN Y**

VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO emitido por la Subdirección de Gestión de Calidad de los Laboratorios de Salud Pública en 2015; adicionalmente se brindan esquemas aplicables según tipo de ensayo y algunas referencias bibliográficas orientativas que pueden ser útiles a la hora de profundizar en los temas de interés.

TIPO DE ENSAYO	ENFOQUE DEL ANÁLISIS	PARÁMETRO A ESTUDIAR	HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS / ESTADÍSTICAS TÍPICAMENTE APLICABLES	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE APOYO
MÉTODOS DE ELISA	CUALITATIVO	PRECISIÓN - ACUERDO	Porcentaje de acuerdo (Total – Positivo – Negativo)	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente)
		PRECISIÓN – CONCORDANCIA	Porcentaje de concordancia Índice kappa (típicamente empleado cuando se pretende comparar dos metodologías analíticas)	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente) JUAN CANALEJO. López de Ullibarri G. Medidas de concordancia – el índice Kappa https://www.fisterra.com/mbe/investiga/kappa/kappa2.pdf HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL. Índice de concordancia http://www.hrc.es/bioest/errores_2.html
		SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD SENSIBILIDAD EXACTITUD	% Sensibilidad % Selectividad/Especificidad % Exactitud Intervalos de confianza Con base en Tabla de contingencia 2 x 2	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente)
	CUANTITATIVO	ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	Porcentaje de recuperación	ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA Validación de métodos analíticos. Barcelona. 2001: Parte I.
		PRECISIÓN – REPETIBILIDAD	Coficiente variación Rango (diferencia entre réplicas)	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (EP 5 versión vigente)
		PRECISIÓN – PRECISIÓN INTERMEDIA	ANOVA (Varianza)	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (EP 5 versión vigente)
MÉTODOS DE ELISA	CUANTITATIVO	LÍMITE DEL BLANCO / LÍMITE DE DETECCIÓN / LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	Límite del blanco Curvas POD	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures (EP 17 versión vigente) AOAC Appendix H: Probability of Detection (POD) as a Statistical Model for the Validation of Qualitative Methods
		EXACTITUD (Frente a un valor establecido por el fabricante o estadísticamente en el LSP de un material de referencia comercial)	T Student para comparación con un valor verdadero Error estándar	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User Verification of Precision and Estimation of Bias (EP 15 versión vigente)

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Conmutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext. 1283 – 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400



TIPO DE ENSAYO	ENFOQUE DEL ANÁLISIS	PARÁMETRO A ESTUDIAR	HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS / ESTADÍSTICAS TÍPICAMENTE APLICABLES	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE APOYO
MÉTODOS PARA ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS	CUANTITATIVO	PRECISIÓN	Coefficiente de variación (%CV) Desviación estándar relativa (RDS) Rango Porcentaje de diferencia relativa (%RPD)	<p>EURACHEM The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (última actualización disponible en www.eurachem.org)</p> <p>INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (última actualización http://www.iupac.org/)</p> <p>STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER Parte 1000 (versión vigente)</p> <p>ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA Validación de métodos analíticos. Barcelona. 2001: Parte I.</p> <p>MILLER & MILLER J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Madrid. 2000. 4ª. Edición</p>
		EXACTITUD	Porcentaje de recuperación Porcentaje de error relativo	
		LINEALIDAD	Análisis de regresión lineal Prueba de bondad de ajuste	
		LÍMITE DE DETECCIÓN / LÍMITE DE CUANTIFICACION	Cálculo por fórmula Evidencia experimental de cumplimiento (Relación %CV vs concentración)	
MÉTODOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	CUALITATIVO	PRECISIÓN - ACUERDO	Porcentaje de acuerdo (Total – Positivo – Negativo)	<p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente)</p> <p>AOAC Appendix J: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces</p>
MÉTODOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	CUALITATIVO	PRECISIÓN – CONCORDANCIA	<p>Porcentaje de concordancia</p> <p>Índice kappa (típicamente empleado cuando se pretende comparar dos metodologías analíticas)</p>	<p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente)</p> <p>JUAN CANALEJO. López de Ullibarri G. Medidas de concordancia – el índice Kappa https://www.fisterra.com/mbe/investiga/kappa/kappa2.pdf</p> <p>HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL. Índice de concordancia http://www.hrc.es/bioest/errores_2.html</p> <p>AOAC Appendix J: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological</p>

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Conmutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext. 1283 - 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400



TIPO DE ENSAYO	ENFOQUE DEL ANÁLISIS	PARÁMETRO A ESTUDIAR	HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS / ESTADÍSTICAS TÍPICAMENTE APLICABLES	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE APOYO
				<p>Methods for Food and Environmental Surfaces</p> <p>STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER Parte 1000 (versión vigente)</p>
		SELECTIVIDAD/ESPECIFICIDAD SENSIBILIDAD EXACTITUD	<p>% Sensibilidad % Selectividad/Especificidad % Exactitud Intervalos de confianza</p> <p>Con base en Tabla de contingencia 2 x 2</p>	<p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente)</p> <p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.. Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems (M50 versión vigente)</p> <p>GTC 84 Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos (última actualización)</p> <p>AOAC Appendix J: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces</p> <p>STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER Parte 1000 (versión vigente)</p>
MÉTODOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	CUALITATIVO	LÍMITE DE DETECCIÓN / LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	<p>LD 50 LD 90</p> <p>Curvas POD</p>	<p>ISO 16140 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative Methods (versión vigente)</p> <p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures (EP 17 versión vigente)</p> <p>AOAC Appendix H: Probability of Detection (POD) as a Statistical Model for the Validation of Qualitative Methods</p> <p>AOAC Appendix J: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces</p> <p>STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER Parte 1000 (versión vigente)</p>

TIPO DE ENSAYO	ENFOQUE DEL ANÁLISIS	PARÁMETRO A ESTUDIAR	HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS / ESTADÍSTICAS TÍPICAMENTE APLICABLES	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE APOYO
	CUANTITATIVO	PRECISIÓN – REPETIBILIDAD	Coefficiente variación Rango (diferencia entre réplicas)	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (EP 5 versión vigente) STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER Parte 1000 (versión vigente)
		PRECISIÓN – PRECISIÓN INTERMEDIA	ANOVA (Varianza)	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (EP 5 versión vigente) STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER Parte 1000 (versión vigente)
		EXACTITUD	T Student para comparación con un valor verdadero Error estándar	CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User Verification of Precision and Estimation of Bias (EP 15 versión vigente)
		PROPORCIONALIDAD	Índice de probabilidad logarítmica de la proporcionalidad	GTC 84 Calidad del agua. Guía para la orientación acerca de la validación de métodos de análisis microbiológicos (última actualización)
MÉTODOS PARASITOLÓGICOS (Determinación de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en aguas por FILTRACIÓN / IMS/ FA)	CUANTITATIVO	PRECISIÓN	Porcentaje de diferencia relativa (%RDP)	United States Environmental Protection Agency EPA. Método <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en Agua por Filtración/IMS/FA (versión vigente)
		EXACTITUD	Índice de precisión y recuperación (IPR) Índice de precisión y recuperación en curso (OPR) Porcentaje de recuperación	
		LÍMITE DE DETECCIÓN / LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	LD ₅₀ LD ₉₀ Curvas POD	AOAC Appendix H: Probability of Detection (POD) as a Statistical Model for the Validation of Qualitative Methods AOAC Appendix J: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces

5.5. Modelo de ejecución

5.5.1. 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”.

TIPO DE ENSAYO	CATEGORÍAS	TRAZABILIDAD	MATRICES
MÉTODOS DE ELISA	Materiales de referencia	Con base en Certificado de caracterización/calidad aportado por el fabricante	Material de referencia comercial
		Con base en identificación asignada por el ente emisor del programa y la caracterización que se conoce cuando se allega el informe de resultados de participación	Muestras de Control de calidad externo remitido al LDSP
	Muestras rutinarias	Con base en identificación única asignada por el LSP a la muestra allegada para estudio , el método empleado para su procesamiento y resultado final	Muestras con caracterización positiva (absorbancias bajas/medias/altas) y muestras negativas
MÉTODOS PARA ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO	Materiales de referencia	Con base en Certificado de caracterización e incertidumbre emitido por el fabricante	Material de referencia certificado primario (fabricado por proveedor acreditado en Guía ISO 34 (para curvas de calibración cuando aplica)) Material de referencia certificado secundario (fabricante NO acreditado en Guía ISO 34)
	Muestras rutinarias	Con base en identificación única asignada por el LSP a la muestra allegada para estudio , el método empleado para su procesamiento y resultado final	Muestras de Agua para consumo humano (tratada – natural superficial y subterránea) Muestras de agua de piscina
MÉTODOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	Materiales de referencia	Con base en Certificado de caracterización e incertidumbre emitido por el fabricante	Material de referencia certificado primario (fabricado por proveedor acreditado en Guía ISO 34 (para curvas de calibración) para ensayos de identificación y susceptibilidad antimicrobiana
	Muestras rutinarias	Con base en identificación única asignada por el LSP a la muestra allegada para estudio , el método empleado para su procesamiento y resultado final	Diferentes matrices allegadas para estudio (Aislamientos, muestras biológicas según microorganismo a estudiar)
		Identificación asignada a las muestras por parte del LSP	Agua (para <i>Vibrio cholerae</i>)

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Conmutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext. 1283 – 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400



TIPO DE ENSAYO	CATEGORÍAS	TRAZABILIDAD	MATRICES
MÉTODOS PARASITOLÓGICOS (Determinación de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en aguas por FILTRACIÓN / IMS/ FA)	Materiales de referencia	Con base en Certificado de caracterización e incertidumbre emitido por el fabricante	Material de referencia certificado primario (fabricado por proveedor acreditado en Guía ISO 34 (para IPR – OPR – Matriz spike)
	Muestras rutinarias	Identificación asignada a las muestras por parte del LSP	Muestras de Agua para consumo humano (tratada – natural superficial y subterránea) Muestras de agua de piscina

5.5.2. 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. (1)

Para establecer el número de muestras a trabajar en el ejercicio de validación, se deben tener en cuenta criterios estadísticamente válidos que permitan definir un tamaño de muestra representativo que a su vez evalúe de manera adecuada el desempeño del método, evaluando adicionalmente el impacto de costo-beneficio frente a los requerimientos analíticos y de los criterios de aseguramiento de la calidad aplicables al LSP (NTC-ISO71EC 17025 / Estándares de Calidad LSP).

El tamaño de muestra debe ser repartido entre muestras positivas y negativas, dando mayor peso a las primeras (en todo el rango de aplicación del método), pero dejando un margen razonable para las segundas, a efectos de poder evaluar adecuadamente la selectividad/especificidad del método cuando el análisis involucra un enfoque cualitativo.

A continuación, se presentan algunos criterios (no se limitan a los detallados), que pueden ser aplicados, con el correspondiente soporte estadístico y/o bibliográfico:

OPCIONES DE CRITERIO / FUENTE BIBLIOGRÁFICA	MÉTODO RELACIONADO	INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE VALIDACIÓN DEL MÉTODO	TAMAÑO DE MUESTRA APROXIMADO
Validación de métodos analíticos A.E.F.I. 2001	MÉTODO DE ELISA	Métodos que declaran especificaciones de desempeño del método basados en estudios internos y externos con un tamaño de muestra representativo (Con un n mayor a 30)	n calculado mediante la herramienta estadística para estimación de una media Utilizando herramienta estadística (ver opciones en Anexo 01 del presente documento). Para ello se deberá contar con el dato de desempeño del método correspondiente a la precisión en términos de coeficiente de variación, desviación estándar relativa, rango o un estadígrafo equivalente. El tamaño de muestra debe ser distribuido en el rango de concentración con clasificación como mínimo en rango alto/medio y bajo (en términos de absorbancias o fluorescencias obtenidas en la caracterización previas de las muestras) y muestras negativas.

OPCIONES DE CRITERIO / FUENTE BIBLIOGRÁFICA	MÉTODO RELACIONADO	INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE VALIDACIÓN DEL MÉTODO	TAMAÑO DE MUESTRA APROXIMADO
<p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User Verification of Precision and Estimation of Bias (EP 15 versión vigente)</p> <p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente)</p>	MÉTODO DE ELISA	Métodos que declaran especificaciones de desempeño del método basados en estudios internos y externos con un tamaño de muestra representativo (Con un n mayor a 30)	<p>El documento CLSI EP 15-A3 plantea lineamientos para evaluación de precisión y exactitud por el usuario (LSP). (Ver anexo 02).</p> <p>El tamaño de muestra debe ser aplicado en el rango de concentración con clasificación como mínimo en rango alto/medio y bajo (en términos de absorbancias o fluorescencias obtenidas en la caracterización previas de las muestras) para la muestras positivas e incluir un panel de muestras negativas.</p>
<p>Teorema del límite central (Referencias bibliográficas (5) y (6))</p>			<p>Un $n \geq 33$ muestras</p> <p>Este tamaño de muestra permite tener un número de datos estadísticamente válido para inferir el comportamiento de una población y adicionalmente suministra un margen razonable (10%) para sustracción de datos atípicos. (Ver Anexo 03)</p> <p>El tamaño de muestra debe ser aplicado en el rango de concentración con clasificación como mínimo en rango alto/medio y bajo (en términos de absorbancias o fluorescencias obtenidas en la caracterización previas de las muestras) para la muestras positivas e incluir un panel de muestras negativas.</p>
<p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (EP 5 versión vigente)</p> <p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente)</p> <p>INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis (última actualización http://www.iupac.org/)</p>	MÉTODOS DE ELISA	Métodos que declaran especificaciones de desempeño del método, pero no especifica el tipo de estudio y/o tamaño de muestra empleado para determinarlas	<p>* EPA05-A3 plantea lineamientos para evaluación de precisión cuando no se tiene conocimiento del desempeño. (Ver anexo 04)</p> <p>* EP 12-A2: Plantea tamaño de muestra para el enfoque cualitativo con 50 muestras positivas y 50 muestras negativas cuando no se tiene conocimiento del desempeño del método.</p> <p>Sobre la base de estos lineamientos y según la información que presente el fabricante y el conocimiento del método (si ha sido trabajado en el LSP), se deberá seleccionar la herramienta para cálculo de tamaño de muestra que de mejor soporte al método de acuerdo a su uso previsto.</p> <p>El tamaño de muestra debe ser aplicado en el rango de concentración con clasificación como mínimo en rango alto/medio y bajo (en términos de absorbancias o fluorescencias obtenidas en la caracterización previas de las muestras) para las muestras positivas e incluir un panel de muestras negativas.</p>

OPCIONES DE CRITERIO / FUENTE BIBLIOGRÁFICA	MÉTODO RELACIONADO	INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE VALIDACIÓN DEL MÉTODO	TAMAÑO DE MUESTRA APROXIMADO
<p>EURACHEM The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (última actualización disponible en www.eurachem.org)</p>	<p>MÉTODOS PARA ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO</p>	<p>A efectos de métodos normalizados para análisis de aguas, los LSP deben adoptar los establecidos en el STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER los cuales típicamente declaran las especificaciones de desempeño de los métodos</p>	<p>$n \geq 13$ muestras para cada matriz incluida en el alcance del método y mínimo en rangos de concentración del analito como mínimo de alto/medio y bajo</p> <p>Se deja un margen de tamaño de muestra, para eventual sustracción de datos atípicos</p>
		<p>Para métodos no normalizados del fabricante que declaran especificaciones de desempeño del método basados en estudios internos y externos con un tamaño de muestra representativo (Con un n mayor a 30)</p>	<p>n calculado mediante la herramienta estadística</p> <p>Utilizando herramienta estadística (ver Anexo 01 del presente documento). Para ello se deberá contar con el dato de desempeño del método correspondiente a la precisión en términos de coeficiente de variación, desviación estándar relativa, rango o un estadígrafo equivalente.</p>
		<p>Métodos que declaran especificaciones de desempeño del método, pero no especifica el tipo de estudio y/o tamaño de muestra empleado para determinarlas</p>	<p>Un $n \geq 33$ muestras</p> <p>Este tamaño de muestra permite tener un número de datos estadísticamente válido para inferir el comportamiento de una población y adicionalmente suministra un margen razonable (10%) para sustracción de datos atípicos. (Ver anexo 03)</p>
<p>Validación de métodos analíticos A.E.F.I. 2001</p> <p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User Verification of Precision and Estimation of Bias (EP 15 versión vigente)</p> <p>CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12 versión vigente)</p>	<p>MÉTODOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</p>	<p>Típicamente los métodos microbiológicos en clínica no declaran especificaciones de desempeño del método, por tanto de alguna forma se deben establecer experimentalmente en el laboratorio con base en un tamaño de muestra estadísticamente significativo, según la bibliografía aplicable desde el ámbito cualitativo y/o cuantitativo</p>	<p>Se recomienda adoptar los criterios establecidos en el Anexo 01 cuando se emplean métodos normalizados.</p> <p>Para métodos no normalizados (del fabricante) como es el caso de equipos semi y automatizados para identificación y susceptibilidad antimicrobiana, se recomienda seguir los criterios establecidos en el Anexo 02.</p>

OPCIONES DE CRITERIO / FUENTE BIBLIOGRÁFICA	MÉTODO RELACIONADO	INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE VALIDACIÓN DEL MÉTODO	TAMAÑO DE MUESTRA APROXIMADO
United States Environmental Protection Agency EPA. Método <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en Agua por Filtración/IMS/FA (versión vigente)	MÉTODOS PARASITOLÓGICOS (Determinación de <i>Cryptosporidium</i> y <i>Giardia</i> en aguas por FILTRACIÓN / IMS/ FA)	El método establece con detalle los criterios de precisión y exactitud para forma parasitaria objeto de identificación y recuento	De acuerdo a los criterios establecidos en el documento normativo para demostrar el aseguramiento de la calidad del resultado. Esta recomendación se emite sobre la base de la relación costo-beneficio del ejercicio dado el elevado costo de cada prueba.

5.5.3. 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. (1)

Es importante determinar la fuente de las muestras a incluir en el ejercicio independientemente de su naturaleza, con el fin de gestionar oportunamente su consecución, cantidad y calidad requeridas. A continuación se propone un esquema general, el cual es susceptible de ajuste según la disponibilidad de los diferentes tipos de materiales/muestras a analizar:

Materiales de referencia certificados (primarios/secundarios): Implican la definición de especificaciones en cuanto a su caracterización y origen (fabricante acreditado Guía ISO 34 para el caso de los MRC primarios), teniendo en cuenta la matriz en la cual se encuentra disponible el analito, la cual en la medida de lo posible debe ser similar o equivalente a la que se maneja en las muestras rutinarias (8). Se recomienda que su peso dentro del panel general de muestras **no supere** el 30% del total de muestras analizadas.

Materiales de referencia: Se recomienda que su peso dentro del panel general de muestras **no supere** el 20% del total de muestras analizadas y pueden corresponder a:

- Muestras remitidas en ejercicios de Ensayos de aptitud (12), teniendo en cuenta que se cuente con la cantidad suficiente, exista similitud en la matriz respecto a las muestras que se analizan rutinariamente, que los niveles del analito se encuentren en concentraciones medias/altas y que el resultado de su caracterización (extractado del informe de participación) haya sido evaluado de manera idéntica por los participantes.
- Paneles comerciales cuyos fabricantes no estén acreditados en Guía ISO 34.
- Muestras remitidas en el marco del proceso de Evaluación Externa del Desempeño liderado por el Laboratorio nacional de Referencia, aplicando las mismas recomendaciones presentadas para los MR provenientes de ensayos de aptitud.

Muestras frescas: Se deben incluir muestras frescas a efectos de obtener la mejor estimación del desempeño del método en las condiciones reales de trabajo (9). El peso de estas muestras en el tamaño total de muestra idealmente debe corresponder al menos a un 20% del panel.

Muestras de retención: Es viable utilizar muestras de retención que han sido previamente caracterizadas en el laboratorio, las cuales deben estar almacenadas en condiciones idóneas con el fin de asegurar la estabilidad del analito en el tiempo (9).

5.5.4. 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. (1)

La caracterización e identificación del panel de muestras debe ser en principio confidencial y custodiado por el Responsable Técnico de Área o el Coordinador del LSP en caso que el Responsable Técnico participe en el ejercicio de validación.

Esta mecánica además de minimizar riesgo de sesgo para el Líder técnico y/o analista, permite que el ejercicio de validación sea transversalizado al de evaluación del desempeño, con las diferencias de rigor en la fase de análisis de datos y enfoque requerido.

5.5.5. Reactivos

Se deben detallar los reactivos utilizados, especificando lote, vencimiento (si aplica) y anexando los respectivos certificados de análisis o trazabilidad de los mismos. (1)

El listado de reactivos a emplear en el ejercicio de validación se debe precisar junto con sus especificaciones técnicas en la fase de diseño. Posteriormente en la fase de informe se debe adicionar lo relacionado a lotes, certificados de calidad asociados, fichas de seguridad y fechas de vencimiento según aplique.

5.5.6. 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. (1)

En la fase de diseño se deben verificar las especificaciones de equipos, cuidando de registrar las operaciones de confirmación metrológicas aplicables y las evidencias de su ejecución **previo** al inicio de la validación.

5.6. Metodología de ejecución

5.6.1. Fundamento del método de ensayo

Se debe detallar el fundamento del método de ensayo. (1)

En el diseño se debe incluir el fundamento declarado en el respectivo procedimiento de ensayo, esto con el fin de asegurar la adecuada interpretación de los resultados al momento del análisis de datos.

5.6.2. Competencia técnica de los Líder técnico y/o analistas

Se debe presentar de manera resumida la evidencia de competencia técnica del personal Líder técnico y/o analista que participa en el ejercicio. (1)

Esta evidencia corresponde a precisar el perfil de educación, formación (cuando aplica) y experiencia con relación al ensayo objeto de validación. A continuación, se amplía el enfoque para cada aspecto:

- Educación: Entendida como su profesión, la cual debe ser afín a la naturaleza del ensayo objeto de validación.

- Formación: Actividades de capacitación y/o entrenamientos específicos que eventualmente puedan ser relevantes para lograr la competencia requerida, por ejemplo, para el caso de ensayos moleculares.
- Experiencia: Entendida como un mínimo de tiempo de experiencia en el montaje del ensayo específico u otro de naturaleza equivalente, según el ensayo objeto de validación. Es recomendable que este tiempo sea como mínimo de seis (6) meses; en toda la competencia técnica derivada de dicha experiencia será validada en el marco del proceso de evaluación del desempeño.

5.6.3.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. (1)

Los datos primarios idealmente se deben recolectar en el formato diseñado para tal fin desde el procedimiento de ensayo relacionado; debe contener como mínimo:

- Referencia al método de ensayo ejecutado, citando el código del procedimiento de ensayo relacionado
- Reactivos utilizados (Lote, marca, vencimiento según aplique) cuando dicha trazabilidad no queda registrada en otro formato.
- Código metrológico/ Número de inventario de los equipos críticos para el ensayo
- Condiciones ambientales cuando éstas influyen en el resultado de ensayo y/o son especificadas en el método adoptado.
- Identificación de los ítems de ensayo (en este caso corresponde a la codificación asignada para el ejercicio)
- Fecha de ejecución del ensayo (fecha de inicio de procesamiento, independientemente de la duración del ensayo)
- Tener espacio para impresión o adhesión de reportes generados por los equipos incluidos en la paginación correlativa del formato. Para el caso de reportes generados en papel térmico, éstos deben ser fotocopiados y adjuntados al respectivo formato de datos primarios.
- Registro de unidades del resultado cuando aplica
- Fórmulas, cálculos relacionados y/o parámetros aplicables para establecer el resultado de ensayo.
- La identificación del Líder técnico y/o analista responsable de la ejecución del ensayo.

5.6.4.Análisis de datos

Se debe aplicar la metodología de análisis de acuerdo al tipo de ensayo y parámetro a estudiar. (1)

Las herramientas típicamente aplicables se detallan en el ítem Parámetros a evaluar del presente documento.

5.6.5.Criterios de aceptación y rechazo

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. (1)

Se deben establecer los criterios de aceptación/rechazo, detallando su fuente y especificación, a continuación, se presentan algunos ejemplos:

Ensayo Dureza total

PARÁMTERO	FUENTE	ESPECIFICACIÓN
Precisión	Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Edition 22 th :2012 Method 2340C	% RDS: 2,9%

Ensayo Determinación de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* por WESTERN BLOT Estuche comercial TESACruzi

PARÁMTERO	FUENTE	ESPECIFICACIÓN
Sensibilidad / Especificidad	Inserto del Fabricante Biomerieux TESACruzi Versión 1	En una evaluación clínica de 651 muestras de sueros de pacientes chagásicos (264) y no chagásicos (387) bien definidos por criterios clínicos, epidemiológicos y laboratoriales el TESACruzi presentó 100% de sensibilidad y 98,7% de especificidad.

5.6.6. 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. (1)

Se debe establecer el esquema de estructuración y presentación del informe de validación, el cual idealmente debe estar compuesto de:

- Informe de validación: Debe desarrollar plenamente los ítems contenidos en el diseño y adicionalmente presentar las conclusiones del ejercicio con una declaración final de cumplimiento del método con las especificaciones definidas.
- Anexos de análisis de datos: Se deben adjuntar las evidencias que presentan el análisis de datos realizados tales como hojas de cálculo, reporte de paquetes de análisis estadísticos, etc.
- Soporte metrológico: Es aconsejable adjuntar en el paquete de Informe de validación, copias de los informes de operaciones de confirmación metrológica de los equipos involucrados en el ejercicio de validación realizado. Esto con el fin de facilitar el acceso a la información puntual en escenarios de revisión interna, seguimiento a Estándares de Calidad LSP, auditorías, etc.
- Datos primarios: Es aconsejable adjuntar los originales (o copias) de los datos primarios registrados durante la ejecución del ejercicio. Esto con el fin de facilitar el acceso a la información puntual en escenarios de revisión interna, seguimiento a Estándares de Calidad LSP, auditorías, etc.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) INSTITUTO NACIONAL DE SALUD – SGCLSP. Lineamientos técnicos para la estandarización y validación de métodos de ensayo. 2015
- (2) SWEDISH NATIONAL FOOD AGENCY - SCIENCE DEPARTMENT. Merino L. Validación II Una estrategia para validar un método analítico. Diseño experimental (en línea) http://sila.achipia.gob.cl/system/files/upload/repositorio/5.1_validacion_ii-plan_fao-achipia.pdf. (consultado en 2016-03) .
- (3) INTERNATIONAL LABORATORY ACCREDITATION COOPERATION - ILAC. Guideline for the Formulation of Scopes of Accreditation for Laboratories. ILAC-G18:04/2010
- (4) EURACHEM The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.
- (5) TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO. INSTITUTO TECNOLÓGICO CHIHUAHUA (en línea) <http://www.itchihuahua.edu.mx/academic/industrial/estadistica1/u0102.pdf> (consultado en 2016-04)
- (6) UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. AULA VIRTUAL DE BIOESTADÍSTICA (en línea) http://e-stadistica.bio.ucm.es/glosario2/teor_limite_central.html (consultado en 2016-04).
- (7) ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA. Validación de métodos analíticos. 2001.
- (8) CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods (EP05-A3). 2014.
- (9) CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User Verification of Precision and Estimation of Bias (EP 15-A3). 2014.
- (10) CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. User protocol for evaluation of qualitative test performance (EP 12- A2). 2008.
- (11) INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). 2005.

ANEXO 01

MODELO APLICANDO TÉCNICA ESTADÍSTICA PARA ESTIMAR UNA MEDIA (7)

El cálculo del tamaño de la muestra se realiza teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- Nivel de confianza: Porcentaje de confiabilidad del resultado; típicamente se asume un 95% de confianza como el valor que brinda un equilibrio entre los errores tipo I y II respecto a la aceptación/rechazo de una determinada hipótesis planteada.
- Potencia de prueba: Se refiere al poder estadístico que se quiere dar a la prueba, es decir la representatividad estadística de la muestra determinada. Típicamente se maneja un rango del 80% al 90%, siendo viable asumir mayor porcentaje teniendo en cuenta que redundará en un aumento del tamaño de la muestra.

Establecer los parámetros:

Probabilidad de error I (Riesgo α)	: Típicamente es asumido como un 5% (0,05)
Nivel de confianza de la prueba	: $1-\alpha$
Probabilidad de error II (Riesgo β)	: Puede escogerse entre un 5 a 20% de acuerdo a la potencia que se desea tenga la prueba (0,05 – 0,20)
Potencia de la prueba	: $1-\beta$
Criterio de repetibilidad (s)	: Proviene de conocimiento previo de la variabilidad en la medición de una muestra determinada
Desviación máxima permitida (d)	: Proviene de información del método en donde se ha establecido el valor total de la variabilidad permitida para el método.
Riesgo α fijado (bilateral) $z_{\alpha/2}$: Corresponde a factor estándar relacionado con el nivel de riesgo para dos colas, de acuerdo a la tabla descrita a continuación.
Riesgo β fijado (unilateral) z_{β}	: Corresponde a factor estándar relacionado con el nivel de riesgo para una cola, de acuerdo a la tabla descrita a continuación.

Valores de z

Riesgo α o β	0.10	0.05	0.01	0.001
Bilateral	1.65	1.96	2.58	3.29
Unilateral	1.28	1.65	2.33	3.09

(Fuente "Validación de métodos analíticos" Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria)

Calcular el tamaño de muestra mediante la aplicación de la fórmula:

$$n = (z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 (s^2 / d^2) + 0.5 (z_{\alpha/2})^2$$

NOTA IMPORTANTES:

- En los documentos adjuntos al presente lineamiento se proporciona archivo Excel para el cálculo por esta metodología.
- En caso que no se cuente con la información relativa al parámetro (s) o (d) se asumirán valores equivalentes para no afectar el cálculo del tamaño de muestra, ya que en la fórmula aplicable se plantean como una relación (división), esta práctica permite obtener el máximo tamaño de muestra posible, el cual corresponde típicamente a quince muestras, las cuales deben ser repartidas de manera equitativa entre positivas y negativas (si está involucrado un análisis cualitativo de los resultados) o en el rango de uso del método a nivel cuantitativo.

A continuación, se ejemplifica un caso aplicable para ensayos de ELISA y microbiológicos cualitativos:

	15 muestras				15 muestras				
Días	1				2				
Analistas	A		B		A		B		
Réplicas	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	
Muestras				15					
Días				2					
Analistas				2					
Réplicas por muestra				2					
	15 x 2 x 2 x 2			120			CAMBIO DE ANALISTA Y DÍA DE MONTAJE		

	Numero de muestras	NÚMERO DE DATOS		
		Al correr por duplicado cada muestra	Por dos días de montaje	Por dos analistas
MUESTRAS POSITIVAS	9	18	36	72
MUESTRAS NEGATIVAS	6	12	24	48
			TOTAL DATA	120

Mismo escenario para un ensayo fisicoquímico en cuanto a esquema de corrida, con obtención de datos así:

	Numero de muestras	NÚMERO DE DATOS		
		Al correr por duplicado cada muestra	Por dos días de montaje	Por dos analistas
RANGO ALTO	5	10	20	40
RANGO MEDIO	5	10	20	40
RANGO BAJO	5	10	20	40
			TOTAL DATA	120

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Comutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext. 1283 - 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400



- En cualquier caso y dado que la herramienta puede arrojar bajos tamaño de muestra según el comportamiento del método, es aconsejable manejar un mínimo de 10 muestras en todo el rango (6 positivas y 4 negativas si se debe realizar análisis desde el ámbito cualitativo o 10 en todo el rango para cuantitativos), con el fin obtener al final una data significativa, que permita sustracción de máximo un dato atípico y poder evaluar el desempeño del método en el ámbito cualitativo (según aplique) y cuantitativo adecuadamente.

A continuación se ejemplifica un caso aplicable para ensayos de ELISA y microbiológicos cualitativos:

:

	10 muestras				10 muestras			
Días	1				2			
Analistas	A		B		A		B	
Réplicas	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii
	Muestras		10					
	Días		2					
	Analistas		2					
	Réplicas por muestra		2					
	9 x 2 x 2 x 2		80		CAMBIO DE ANALISTA Y DÍA DE MONTAJE			

	Numero de muestras	NÚMERO DE DATOS		
		Al correr por duplicado cada muestra	Por dos días de montaje	Por dos analistas
MUESTRAS POSITIVAS	6	12	24	48
MUESTRAS NEGATIVAS	4	8	16	32
			TOTAL DATA	80

Mismo escenario para un ensayo fisicoquímico en cuanto a esquema de corrida, con obtención de datos así:

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Conmutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext. 1283 - 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400

	Numero de muestras	NÚMERO DE DATOS		
		Al correr por duplicado cada muestra	Por dos días de montaje	Por dos analistas
RANGO ALTO	3	6	12	24
RANGO MEDIO	3	6	12	24
RANGO BAJO	4	8	16	32
			TOTAL DATA	80

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Conmutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext.1283 – 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400



ANEXO 02

MODELO CLSI EP 15- A3 / CLSI EP 12-A2 / ICH Q2R1 [(9) / (10) / (11)]

Este documento presenta la opción de evaluación del método trabajando cinco días, cinco réplicas de muestra cada día para obtención de un total de 25 datos. Sin embargo se debe tener en cuenta que este diseño (5 x 5) NO contempla la evaluación de precisión intermedia entre Líder técnico y/o analistas, lo cual a efectos de validación en el marco de Estándares de Calidad LSP y acreditación se debe cumplir. Con base en lo anterior, a continuación se presenta una opción de adaptación del diseño:

Número de muestras: Dado que el documento declara el uso de mínimo dos muestras para el tamaño de muestra, lo cual no da el soporte requerido para evaluación de precisión intermedia con cambio de Líder técnico y/o analista según ya se explicó, se aconseja adoptar los establecidos para estudios de repetibilidad en el documento (11), el cual corresponde a trabajar:

- Muestras positivas: Tres niveles de concentración con mínimo tres muestras por nivel, para un total de 9 muestras positivas en todo el rango de uso del método.
- Muestras negativas: Dado que los ensayos de ELISA deben ser evaluados desde el ámbito cualitativo y cuantitativo y con el fin de contar con un tamaño de muestra representativo para evaluar selectividad/especificidad se recomienda trabajar mínimo nueve (9) muestras negativas.

Este modelo de tamaño de muestra adicionalmente permite dar un equilibrio efectivo entre 50% de muestras positivas y 50% de muestras negativas según declara el documento CLSI EP12-A2 (10) y no representa mayor inversión respecto al esquema planteado según el Anexo 01.

Diseño de corrida: Se trabajarán las 18 muestras según lo establecido en la viñeta anterior, las cuales serán procesadas por dos Líder técnico y/o analistas en dos días diferentes. A continuación se presenta el modelo de corrida propuesto:

	18 muestras				18 muestras				
Días	1				2				
Analistas	A		B		A		B		
Réplicas	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	
	Muestras		18						
	Días		2						
	Analistas		2						
	Réplicas por muestra		2						
	18 x 2 x 2 x 2		144		CAMBIO DE ANALISTA Y CAMBIO DE DIA DE MONTAJE				



	Numero de muestras	NÚMERO DE DATOS		
		Al correr por duplicado	Por dos días de montaje	Por dos analistas
MUESTRAS POSITIVAS	9	18	36	72
MUESTRAS NEGATIVAS	9	18	36	72
			TOTAL DATA	144

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Conmutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext.1283 – 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400



ANEXO 03

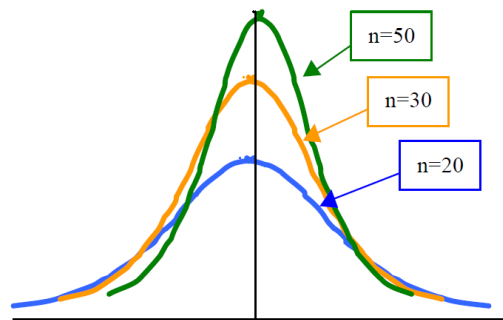
**MODELO DE TAMAÑO DE MUESTRA DESDE EL TEOREMA DEL LÍMITE CENTRAL
/ CLSI EP 12-A2 [(5) / (6) / (10)]**

Tomando lo establecido desde el Teorema del Límite Central y algunas referencias bibliográficas declaradas en este documento, se puede definir de manera general la representatividad de un $n \geq 30$ como un tamaño de muestra estadísticamente válido para la evaluación del desempeño de un método de ensayo, adicionando tres (3) muestras más, con el fin de contar con un margen razonable de sustracción de datos atípicos (10%) de la totalidad que pasa a la fase de análisis en el marco de la validación. Cabe anotar que referencias bibliográficas CLSI (EP 05-A3) declaran que el máximo porcentaje para sustracción de datos atípicos no debe superar el 3%. A continuación se registra textualmente la información consultada, la cual soporta la conclusión presentada en este párrafo:

Teorema del límite central (5):

Teorema del límite central

Si se seleccionan muestras aleatorias de n observaciones de una población con media μ y desviación estándar σ , entonces, cuando n es grande, la distribución muestral de medias tendrá aproximadamente una distribución normal con una media igual a μ y una desviación estándar de $\frac{\sigma}{\sqrt{n}}$. La aproximación será cada vez más exacta a medida de que n sea cada vez mayor.



Teorema del límite central (6):

Si X_1, X_2, \dots, X_n son variables aleatorias (discretas o continuas) independientes, con idéntico modelo de probabilidad, de valor medio μ y varianza σ^2 , entonces la distribución de la variable

$$Z = \frac{(X_1 + X_2 + \dots + X_n) - n\mu}{\sigma\sqrt{n}} = \frac{(\sum_{i=1}^n X_i) - n\mu}{\sigma\sqrt{n}}$$

se aproxima a la de una variable normal tipificada $N(0, 1)$, mejorándose la calidad de la aproximación a medida que n aumenta. Este resultado prueba que el estadístico o estimador media muestral

$$\bar{x} = \frac{X_1 + X_2 + \dots + X_n}{n} = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{n}$$

se distribuye aproximadamente como una variable

$$N(\mu, \frac{\sigma}{\sqrt{n}})$$

o, de manera equivalente, que $\frac{\bar{x} - \mu}{\sigma/\sqrt{n}}$

se distribuye aproximadamente como una variable $N(0,1)$

Con carácter general, o al menos en los modelos de probabilidad clásicos, se admite una aproximación aceptable al modelo normal siempre que n sea mayor o igual que 30, a pesar de que esta cifra es insuficiente en determinados casos y excesiva en otros; por lo que debemos ser cautelosos en su aplicación.

Número de muestras: Este tamaño de muestra ($n \geq 33$) distribuidas entre muestras positivas (se sugiere trabajar 17 en todo el rango de uso del método) y muestras negativas (se sugiere trabajar 16), permite tener un número de datos estadísticamente válido para inferir el comportamiento de una población. Adicionalmente suministra un margen razonable (10%) para sustracción de datos atípicos y un equilibrio entre muestras positivas/negativas según demanda el documento CLSI EP12-A2 (10).

Diseño de corrida: Se trabajarán las 33 muestras procesadas por dos Líder técnico y/o analistas en dos días diferentes.

A continuación, se presenta el modelo correspondiente a un ensayo de ELISA:

		33 muestras					33 muestras				
Días		1					2				
Analistas		A		B			A		B		
Réplicas		i	ii	i	ii		i	ii	i	ii	
	Muestras			33							
	Días			2							
	Analistas			2							
	Réplicas por muestra			2							
	33 x 2 x 2 x 2			264		CAMBIO DE ANALISTA Y CAMBIO DE DÍA DE MONTAJE					

	Numero de muestras	NÚMERO DE DATOS		
		Al correr por duplicado cada muestra	Por dos días de montaje	Por dos analistas
MUESTRAS POSITIVAS	17	34	68	136
MUESTRAS NEGATIVAS	16	32	64	128
			TOTAL DATA	264

Mismo escenario para un ensayo fisicoquímico en cuanto a esquema de corrida, con obtención de datos así:

	Numero de muestras	NÚMERO DE DATOS		
		Al correr por duplicado cada muestra	Por dos días de montaje	Por dos analistas
RANGO ALTO	11	22	44	88
RANGO MEDIO	11	22	44	88
RANGO BAJO	11	22	44	88
			TOTAL DATA	264

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Conmutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext. 1283 - 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400



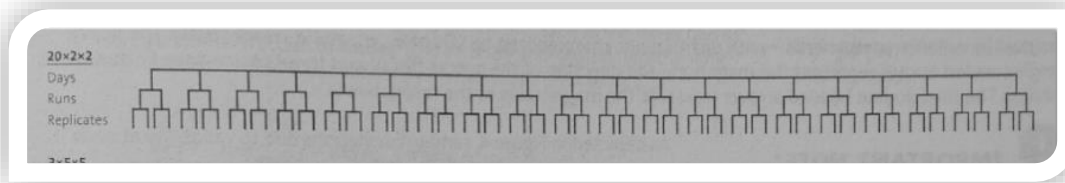
ANEXO 04

MODELO CLSI EP 05- A3 / CLSI EP 12-A2 / ICH Q2R1 [(8) / (10) / (11)]

Este documento presenta opciones de diseño experimental para evaluación del método, **cuando no se conoce con detalle el desempeño del mismo**. El análisis que se presenta a continuación representa una argumentación técnica muy válida para dimensionar las decisiones que se tomen a la hora de seleccionar las metodologías comerciales a emplear en el laboratorio en coherencia con su responsabilidad de asegurar la calidad del resultado.

De igual forma revela técnicamente la importancia de revisar con detalle la información que presenta el fabricante sobre la validación primaria de su método, para que sea el punto de partida en la toma de decisiones respecto a la adopción de la metodología. Los modelos son bastante exigentes a efectos del tamaño de muestra; el LSP debe evaluar su viabilidad y relación costo-beneficio frente a la decisión de adoptar determinada metodología para su rutina analítica.

A continuación se presenta el diseño declarado en (8) para evaluación completa de precisión; sin embargo se debe tener en cuenta que al igual que en la herramienta anterior (Anexo 03), estos NO contemplan la evaluación de precisión intermedia entre Líder técnico y/o analistas:



El alto costo que puede representar aplicar este diseño para diferentes Líder técnico y/o analistas (al menos dos, en 20 días diferentes según plantea el diseño original, trabajando un mínimo tamaño de muestra de 18 (9 positivas – 9 negativas) se presenta a continuación:

	18 muestras				18 muestras				18 muestras				18 muestras				18 muestras			
Días	1				5....				10				15				20			
Analistas	A		B		A		B		A		B		A		B		A		B	
Réplicas	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii
Muestras	18				18				18				18				18			
Días	20				20				20				20				20			
Analistas	2				2				2				2				2			
Réplicas por muestra	2				2				2				2				2			
18 x 20 x 2 x 2	1440				1440				1440				1440				1440			
CAMBIO DE ANALISTA Y CAMBIO DE DIA DE MONTAJE																				
TOTAL DATA																				

Por lo anterior, se propone una adaptación del mismo, el cual incluye desafío del panel completo, cada muestra por duplicado, procesado por dos Líder técnico y/o analistas, restringiendo los días de montaje a cinco (criterio básico de días de montaje declarado en (9)), tomando como base que se trata que un método desarrollado por un fabricante que debe haber realizado su validación primaria con un nivel de robustez básico para ser autorizado a su comercialización. A continuación se detallan los lineamientos relacionados:

Número de muestras: Dado que el documento (8) no define criterios estadísticos para el tamaño de muestra, se aconseja adoptar los establecidos para estudios de repetibilidad en el documento (11), el cual corresponde a trabajar:

- Muestras positivas: Tres niveles de concentración con mínimo tres muestras por nivel, para un total de 9 muestras positivas en todo el rango de uso del método.
- Muestras negativas: Dado que los ensayos de ELISA deben ser evaluados desde el ámbito cualitativo/cuantitativo y con el fin de contar con un tamaño de muestra representativo para evaluar selectividad/especificidad se recomienda trabajar mínimo nueve (9) muestras negativas.

Este modelo de tamaño de muestra adicionalmente permite dar un equilibrio entre 50% de muestras positivas y 50% de muestras negativas según declara el documento CLSI (10).

Diseño de corrida: Se trabajarán las 18 muestras según lo establecido previamente, en un diseño (18 x 5 x 2 x 2) así:

	18 muestras				18 muestras				18 muestras				18 muestras				18 muestras			
Días	1				2				3				4				5			
Analistas	A		B		A		B		A		B		A		B		A		B	
Réplicas	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii	i	ii
Muestras	18																			
Días	5																			
Analistas	2																			
Réplicas por muestra	2																			
18 x 5 x 2 x 2	360																			

CAMBIO DE ANALISTA Y CAMBIO DE DIA DE MONTAJE

	Numero de muestras	NÚMERO DE DATOS		
		Al correr por duplicado cada muestra	Por cinco días de montaje	Por dos analistas
MUESTRAS POSITIVAS	9	18	90	180
MUESTRAS NEGATIVAS	9	18	90	180
			TOTAL DATA	360

Av. Calle 26 No. 51-20, Bogotá, D.C., Colombia

Conmutador: (1) 220 7700 Ext. 1703 - 1704

fax 220 7700 Ext. 1283 - 1269

e-mail: contactenos@ins.gov.co Página web: www.ins.gov.co

línea gratuita nacional: 018000 113 400

