



**OFICINA DE ACREDITACION
GUATEMALA, C.A.**

OGA-GEC-016

***“Política de Selección y Validación
de Métodos de Ensayo ”***

Guatemala, 29 enero 2007

Política de la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA) Para la Selección y Validación de Métodos de Ensayo

1 Preámbulo

La utilización de métodos de ensayo, adecuados para el propósito, permite obtener resultados trazables con un nivel apropiado de incertidumbre; dichos resultados comúnmente son usados como base para la toma de decisiones financieras, regulatorias, etc., relacionadas con el desarrollo y fabricación de productos, así como con la prestación de servicios y otras actividades de importancia en las economías nacionales, regionales e internacionales.

Los métodos de ensayo seleccionados, sean éstos normalizados, no normalizados o desarrollados por el laboratorio, deben estar adecuadamente validados y documentados, previo a su uso. Debe mencionarse que actualmente no existe una sola fuente o autoridad reconocida a nivel internacional respecto a la validación de métodos de ensayo; por lo anterior, aunque hay avances, aún no existe acuerdo unánime entre las diferentes disciplinas, respecto a la interpretación de algunos términos relacionados con el proceso de validación y a la aplicación de los mismos.

2 Propósito

El propósito del presente documento es definir una política para la selección y validación de métodos de ensayo a ser aplicada por la OGA en la evaluación de los laboratorios que le soliciten su acreditación, en evaluaciones de seguimiento y re evaluaciones.

Esta política es acorde a lo internacionalmente aceptado, y aplicado a nivel nacional, y por ello facilitará establecer los Acuerdos de Reconocimiento con la Cooperación Internacional para la Acreditación de Laboratorios (ILAC, por sus siglas en inglés), la Cooperación Interamericana de Acreditación (IAAC, por sus siglas en inglés) y otras Cooperaciones Regionales y Organismos Nacionales de Acreditación.

3 Introducción

El reconocimiento formal de la competencia técnica de los laboratorios de ensayo es uno de los principales objetivos de la OGA, con el fin de que los resultados que estos organismos emitan sean aceptados a nivel nacional, regional e internacional.

El contenido de la política tratada en el presente documento es de carácter general y aplica a las distintas disciplinas cubiertas por los laboratorios de ensayo. A modo de ejemplo, en la sección de Fundamentos, Anexo 2 de este documento, se incluyen algunas de las interpretaciones y formas de aplicación de los términos relacionados con la validación y verificación de los métodos de ensayo, usuales en ciertas disciplinas.

Dada la situación internacional descrita en el preámbulo, existen factores fuera del alcance de la OGA que influyen en el desarrollo y la revisión de su política de selección y validación de los métodos de ensayo.

Los requisitos sobre la selección y validación de los métodos de ensayo, que deben cumplir los laboratorios, se exponen en el capítulo 5.4 Métodos de ensayo y calibración y validación

de métodos, de la Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025 “Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración”.

4 Política de la OGA sobre la selección y validación de los métodos de ensayo

Es común que para la determinación de cierto analito en un tipo específico de muestra haya varios métodos analíticos disponibles, de orígenes muy variados. Existen muchas entidades nacionales e internacionales que publican métodos para los diferentes campos analíticos (físicos, químicos y biológicos) y sus aplicaciones. El laboratorio usuario de la metodología debe evaluar los diferentes métodos disponibles y seleccionar aquel que mejor se adecue a las necesidades y los recursos del caso.

El método seleccionado debe haber sido validado como parte de su desarrollo. Además, como parte de la implementación del método, el laboratorio usuario debe verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación. La verificación del método, unida a la cualificación del equipo involucrado, permite evaluar el desempeño del sistema completo y, por ende, su adecuación al propósito del análisis, demostrando así el laboratorio usuario que domina el método y lo usa correctamente.

4.1 Selección de los Métodos de Ensayo

- Es responsabilidad del laboratorio utilizar los métodos apropiados para el propósito, según el alcance requerido. Estos métodos pueden ser normalizados, no normalizados o desarrollados por el propio laboratorio.
(Ver definiciones en Anexo 1)
- El laboratorio, de común acuerdo con el cliente, puede seleccionar los métodos utilizando su propio criterio o utilizar aquellos métodos normalizados vigentes en el país.
- Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe demostrar que éste corresponde a la última edición, a menos que sea apropiado o posible el uso de una versión anterior del método.
- Cuando el laboratorio utilice un método normalizado, debe establecer un sistema para evaluar la factibilidad de implementar los posibles cambios introducidos en las nuevas versiones del método, determinando las diferencias en cuanto a equipo, formación del personal, instalaciones, y demás aspectos necesarios para la ejecución del ensayo.

4.1.1 Métodos Normalizados

Las normas de calidad y regulaciones frecuentemente requieren el uso de métodos normalizados. A la vez, el uso de métodos normalizados es deseable en situaciones en las que el método será ampliamente utilizado; sin embargo, algunas veces el laboratorio puede contar con un método propio más adecuado para el propósito. Los métodos normalizados deben ser utilizados por el laboratorio exactamente como están descritos.

4.1.2 Métodos No Normalizados

Los métodos no normalizados deben estar apropiadamente validados para poder utilizarlos, ya sean éstos desarrollados por un tercero o resultado de la modificación de un método normalizado. En el caso de modificaciones, es necesario demostrar que éstas no tienen una repercusión sobre la calidad de los resultados.

La nota del numeral 5.4.4 de la Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025, adoptada por la OGA como un criterio de acreditación para laboratorios de ensayo y calibración, establece que el laboratorio debe desarrollar un procedimiento de ensayo que incluya al menos la siguiente información, previo a la utilización de un nuevo método:

- la identificación apropiada;
- el alcance;
- la descripción del tipo de objeto a ensayar o a calibrar;
- los parámetros o magnitudes a ser determinados y los rangos correspondientes;
- los aparatos y equipos, incluyendo los requisitos de desempeño técnico;
- los patrones de referencia y materiales de referencia requeridos;
- las condiciones ambientales requeridas y cualquier período de estabilización necesario;
- la descripción del procedimiento, incluyendo:
 - la colocación de marcas de identificación, manejo, transporte, almacenamiento y preparación de ítems
 - la verificación a realizar antes de comenzar el trabajo
 - la verificación que el equipo está trabajando apropiadamente y, cuando sea necesario, ajustar y calibrar el equipo antes de cada uso
 - el método de registro de las observaciones y los resultados
 - las medidas de seguridad a observar
- los criterios o requisitos para la aprobación o el rechazo;
- los datos a ser registrados y el método de análisis y presentación;
- la incertidumbre o el procedimiento para estimarla.

Además, la documentación del método debe incluir las especificaciones principales resultantes de la validación.

4.1.3 Métodos Desarrollados por el Laboratorio

- Cuando sea el caso, el laboratorio debe demostrar que tiene un plan en el que se incluye la evaluación de su capacidad en cuanto a personal, equipo y demás recursos que le permitan desarrollar métodos propios.
- Los métodos desarrollados por el laboratorio deben estar adecuadamente validados, documentados y autorizados antes de su uso. Cuando sea posible, se debe emplear material de referencia con una matriz equivalente a la de la muestra, o bien debe utilizarse un método de ensayo normalizado alterno, preferiblemente de diferente principio de medición, para comparar los resultados. Estos métodos deben cumplir al menos los mismos requisitos de documentación indicados en el numeral 4.1.2.

4.2 Validación de los Métodos de Ensayo

En el diseño y desarrollo de métodos, la etapa de validación consiste en el proceso de examinar el método para determinar su conformidad con el uso previsto. La validación normalmente se lleva a cabo sobre la versión final del método desarrollado, bajo condiciones de operación definidas; también puede ser necesario realizarla en etapas previas del proceso de desarrollo. Si existen diferentes usos previstos para el método, se deben llevar a cabo múltiples validaciones. Los parámetros de desempeño que se recomienda incluir en la validación y verificación de diferentes métodos de ensayo pueden ser, según el caso: exactitud, exactitud relativa, desviación, desviación positiva, desviación negativa, efecto matricial, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, sensibilidad, robustez y fortaleza (*ruggedness*), entre otras.

(Ver definiciones en Anexo 1)

La validación de los métodos de ensayo debe reflejar las condiciones reales de la aplicación de los mismos. Esto puede conseguirse utilizando, por ejemplo, muestras comerciales o preparadas en el laboratorio con un nivel conocido de la especie o analito de interés. El analista debe estar consciente que una muestra preparada en la matriz de interés sólo imita parcialmente a una muestra real; no obstante, en muchos casos, ésta es la mejor y la única opción disponible. La extensión de la validación depende del propósito del ensayo y de las propiedades del método analítico en cuestión.

Cuando aplique, la validación de un método debe incluir la estimación de la incertidumbre (ver OGA-GEC-015 Política sobre Incertidumbre de Medición para Laboratorios), y además abarcar factores que determinan la desviación (error sistemático) y la recuperación imperfecta (medición de la recuperación del analito con el que se haya enriquecido la muestra, medición de blancos, estudio de interferencias y efectos de matriz). Esta estimación también debe considerar aspectos como la homogeneidad y estabilidad de la muestra.

Los laboratorios deben conservar los datos sobre la validación de los sistemas de ensayo comerciales (kits) que utilicen, de preferencia remitidos por los fabricantes. Al presentarse el caso de no contar con los datos del fabricante, o no disponer de datos sobre validación generados por otra fuente, o si éstos no son plenamente aplicables, el laboratorio deberá desarrollar un procedimiento para calcular y evaluar los parámetros de desempeño que considere necesarios para asegurar la confiabilidad del sistema de ensayo comercial. Este procedimiento de validación puede incluir ejercicios de intercomparación.

El laboratorio que desarrolla o modifica un método analítico, o la entidad que lo publica, es responsable de su validación, para con ello demostrar que se adecua al propósito para el cual fue diseñado. El laboratorio que implementa un método analítico es responsable de verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación, tanto antes de ponerlo en uso como durante su utilización rutinaria, para demostrar que lo domina y usa correctamente.

A continuación se especifica lo anterior, para el caso de los métodos normalizados, no normalizados y desarrollados por el laboratorio usuario. (Ver, adicionalmente, las recomendaciones para el procedimiento de validación presentadas en el “Anexo 2. Fundamentos y aplicaciones”).

Caso 1 - Método Normalizado:

El laboratorio que va a utilizar un método normalizado debe verificarlo contra sus especificaciones de validación, atendiendo los requisitos para el aseguramiento de la calidad, y no necesita validarlo. Esta verificación permite demostrar que el laboratorio domina el ensayo y lo utiliza correctamente (el uso corresponde al propósito para el que fue desarrollado, con respecto a propiedad medida, matriz, rango, equipos utilizados, repetibilidad, etc.).

En la mayoría de los casos se puede considerar que en el desarrollo de los métodos normalizados se han tenido en cuenta todos los aspectos necesarios relativos a la validación. Al presentarse el caso de no haber evidencia suficiente para deducir que se ha llevado a cabo una correcta validación, el laboratorio usuario deberá definir un procedimiento para calcular y evaluar los parámetros de desempeño que considere necesarios para asegurar la confiabilidad del método.

Caso 2 - Método No Normalizado:

El laboratorio que va a modificar un método normalizado debe revalidarlo para demostrar que las especificaciones del método original no se ven afectadas por la modificación introducida. El nivel de revalidación requerido aumenta conforme la magnitud de los cambios realizados. Se consideran cambios menores, por ejemplo, la modificación del tamaño de la muestra y sustitución de reactivos. Se considera cambio mayor, por ejemplo, el cambio de procedimiento o equipo y cambios en el alcance (aplicación a matrices que no se especifican). Para demostrar que una versión modificada de un método cumple las mismas especificaciones que el método original, se deben realizar comparaciones utilizando réplicas. El diseño experimental y el análisis de los resultados deben ser estadísticamente válidos. El laboratorio usuario de un método normalizado modificado debe verificarlo contra sus especificaciones originales, o de revalidación, y así demostrar que domina el ensayo y lo utiliza correctamente

En el caso de métodos no normalizados, los terceros que los desarrollan son responsables de incluir en dicho proceso la etapa de validación, para demostrar que el método cumple con los criterios de aceptación adecuados para el propósito de aplicación; el laboratorio usuario debe verificar el desempeño del método contra sus especificaciones de validación y así demostrar que domina el ensayo y lo realiza correctamente.

Caso 3 - Método desarrollado por el laboratorio:

El laboratorio que desarrolla y utiliza sus propios métodos debe validarlos, para demostrar que cumplen con los criterios de aceptación adecuados para el propósito de aplicación. Una vez está en uso el método, el laboratorio debe verificar su desempeño contra los parámetros de validación, para demostrar que sigue dominando el ensayo y lo realiza correctamente.

4.3 Revisión de los métodos de ensayo incluidos en el alcance

Para cada sector técnico, la alta dirección debe nombrar a una persona experimentada como responsable de la revisión de los métodos, con el fin de incluir modificaciones,

actualizaciones o desarrollar e implementar nuevos métodos. Como parte de la revisión se debe incluir, pero no circunscribirse a, lo indicado a continuación.

- Para confirmar que el método se ajusta al uso previsto en el laboratorio es necesario determinar su desempeño (verificar) conforme una o una combinación de las siguientes técnicas, según lo establecido en la nota 2 del numeral 5.4.5.2 de la Norma COGUANOR NTG/ISO/IEC 17025, adoptada por la OGA como un criterio de acreditación para laboratorios de ensayo y calibración:
 - la calibración utilizando patrones de referencia o materiales de referencia;
 - la comparación con resultados obtenidos por otros métodos;
 - las comparaciones interlaboratorios (ver Política Ensayos de Aptitud, OGA-GAC-014);
 - la evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado;
 - la evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en el conocimiento científico de los principios teóricos del método y en la experiencia práctica.

- Aún cuando se haya realizado la validación del método, el laboratorio tendrá que verificar periódicamente que se cumplen los parámetros de desempeño documentados por parte de la organización que lo desarrolló, modificó y/o publicó. Para esta verificación el laboratorio puede utilizar, por ejemplo, muestras inoculadas o materiales de referencia incorporados a las matrices más representativas. También tiene que tomar en cuenta los resultados obtenidos de las auditorías internas y externas de sus sistemas de gestión, dejando registro de las verificaciones.

- La documentación de la modificación, actualización, validación y verificación del método debe incluir registros de la determinación de los parámetros de desempeño, limitaciones de su aplicabilidad, procedimientos para control de calidad, calibración y control de documentos. Estos registros deben estar disponibles a solicitud de los miembros del equipo evaluador durante las visitas en sitio, ya sea de evaluación para la acreditación, seguimiento o reevaluación.

- Los procedimientos y responsabilidades para el desarrollo, validación, verificación e implementación de los métodos deben ser descritos en detalle dentro de la documentación del sistema de calidad del laboratorio. Los diagramas de flujo son una herramienta para describir el procedimiento; para métodos complejos también se pueden utilizar programas informáticos de gestión de procesos. El personal responsable debe dejar establecidos los requisitos mínimos de calidad antes de empezar el proceso de validación e implementación del método, o mejor aún establecerlos antes de comenzar todo el proceso de desarrollo.

Para ensayos acreditados, cuando el método es modificado, actualizado o sustituido por uno nuevo, el caso debe ser analizado por la OGA, antes de que se pueda considerar incluido dentro del alcance de la acreditación, según se indica en los documentos OGA-PGE-006, Procedimiento General de Acreditación y OGA-PEC-007, Procedimiento de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración.

5 Vigencia y Revisiones

Esta política entrará en vigencia seis meses después de su publicación por parte de la OGA.

La OGA considera que esta política necesitará ser revisada y actualizada, conforme su aplicación y las tendencias internacionales pertinentes.

6 Referencias

APHA/AWWA/WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition. American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Environment Federation. USA. 1998.

BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML. International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM:1993). ISO.

Brown, R., Caphart, M., Faustino, P., Frankewich, R., Gibbs, J., Leutzinger, E., Lunn, G. Ng, L., Rajagopalan, R., Chiu, Y., Sheinin, E. Analytical Procedures and Method Validation: Highlights of the FDA's Draft Guidance. LCGC Vol. 19, No. 1, 2001.

Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y. C., Zhang, X.M. (Eds.). Analytical Method Validation and Instrumentation Performance Verification. Wiley-Interscience. USA. 2004

CITAC/EURACHEM. Guide to Quality in Analytical Chemistry. An Aid to Accreditation. 2002.

COGUANOR. Norma COGUANOR NTG ISO/IEC 17025 Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y de Calibración.

COGUANOR. Norma COGUANOR NGR/ISO 9000:2000 Sistemas de Gestión de Calidad-Fundamentos y Vocabulario.

Dux, J. Handbook of Quality Assurance for the Analytical Chemistry Laboratory. 2 Ed. Chapman & Hall. USA,1990

ENAC. CGA-ENAC-LEC:2001 Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración.

ENAC. G-ENAC-04:2002 Guía para la acreditación de laboratorios que realizan análisis microbiológicos.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Web Edition. 1998.

EURACHEM/CITAC. Traceability in Chemical Measurement, A guide to achieving comparable results in chemical measurement. 2003.

Garfield, F. M. Principios de Garantía de Calidad para Laboratorios Analíticos. AOAC Internacional. EUA, 1993.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline Q2A Text on Validation of Analytical Procedures. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1994.

ICH. Harmonised Tripartite Guideline Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 1994.

ILAC. ILAC-G18:2002 The Scope of Accreditation and Consideration of Methods and Criteria for the Assessments of the Scope in Testing.

ISO. Standard ISO/TR 13843:2000 Water quality – Guidance on Validation of Microbiological Methods.

IUPAC. Compendium on Analytical Nomenclature. Chap 18, QA Processes. Web Edition. 2002

Johnson, J. D., Van Buskirk, G. E. Analytical Method Validation. Journal of Validation Technology. Vol. 2, No. 2, 1996, p 88-105.

Kenkel, J. A Primer on Quality in the Analytical Laboratory. National Science Foundation / Lewis Publishers - CRC Press LLC. USA. 2000.

NCCLS. Approved Guideline Document GP21 A Quality System Model for Health Care. National Committee of Clinical Laboratory Standards (Samaza, K, Ed.). USA. 1999.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. Fundamentals of Analytical Chemistry. 6th. Ed. Saunders College Publishing. USA. 1992.

USP. United States Pharmacopeia 28 and National Formulary 23. United States Pharmacopeial Convention. USA. 2005.

7 Anexos

Anexo 1 Definiciones

Anexo 2 Fundamentos y Aplicaciones

Anexo 1

Definiciones

1. **Adecuado para el propósito:** Grado en el que los datos resultantes de un proceso de medición le permiten al usuario tomar decisiones técnica y administrativamente correctas para el propósito establecido. (Ref. IUPAC).
2. **Analito:** Especie de interés a determinar en un análisis. (Ref. Chan et al.).
3. **Calibración:** Conjunto de operaciones que permiten establecer, en condiciones específicas, la relación existente entre los valores indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida material o un material de referencia, y los valores correspondientes obtenidos mediante un patrón de referencia. (Ref. G-ENAC-04).
4. **Desviación (Bias):** Error sistemático de un proceso de medición. (Ref. CITAC/EURACHEM).

Nota: A la desviación también se le conoce como recuperación. Es importante, además de evaluar la desviación, estimar la incertidumbre de medición asociada e incluirla dentro del estimado total de la incertidumbre de medición.

5. **Desviación negativa:** Ocurre, en análisis cualitativo, cuando el método alternativo da un resultado negativo sin confirmación y el método de referencia da un resultado positivo. Esta desviación se convierte en un resultado negativo falso cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es positivo. (Ref. G-ENAC-04).
6. **Desviación positiva:** Ocurre, en análisis cualitativo, cuando el método alternativo da un resultado positivo sin confirmación y el método de referencia da un resultado negativo. Esta desviación se convierte en un resultado positivo falso cuando puede demostrarse que el resultado verdadero es negativo. (Ref. G-ENAC-04).
7. **Efecto matricial:** La alteración o interferencia directa o indirecta en respuesta a la presencia de otros analitos o sustancias interferentes en la muestra. (Ref. ICH).
8. **Ensayo/Prueba:** Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento. (Ref. COGUANOR NGR/ISO 9000:2000).

Para los métodos de ensayo en productos farmacéuticos y afines, la definición tiene las siguientes implicaciones (Ref. ICH):

- **Ensayo de identificación:** Asegurar la identidad del analito.
- **Ensayos de determinación de impurezas y compuestos de degradación:** Asegurar que todos los procedimientos desarrollados permiten una exacta aseveración del contenido de impurezas de un analito (por ej. sustancias relacionadas, ensayos de metales pesados, límite de impurezas volátiles orgánicas).
- **Ensayos de medición y específicos:** Proveer un resultado exacto, que permita una aseveración acerca del contenido o la potencia de un analito en una muestra.

El término análisis se usa para designar cierto tipo de ensayo/prueba. Los análisis cualitativos determinan la identidad o presencia de la especie de interés (analito) en una muestra y proveen información no numérica sobre su naturaleza, la evidencia de su presencia, o la evidencia de su ausencia a concentraciones mayores que las del límite de detección del correspondiente método. Los análisis cuantitativos determinan la cantidad relativa de analito presente en una muestra (concentración) y requieren tener la información cualitativa pertinente; la concentración se expresa en términos de partes de analito en partes de muestra, sean éstas masa/masa, masa/volumen, volumen/volumen u otro tipo de unidades. Para ambos casos, se requiere usar muestras conocidas como referencia de comparación. (Ref. Skoog et al)

9. **Especificación:** Documento que establece requisitos. (Ref. COGUANOR NGR/ISO 9000:2000).

Nota: una especificación puede estar relacionada a actividades (por ejemplo, procedimiento documentado, especificación de proceso y especificación de ensayo/prueba), o a productos (por ejemplo, una especificación de producto, una especificación de desempeño y un plano).

10. **Especificidad:** Capacidad de un método de determinar inequívocamente un analito/parámetro en presencia de los otros componentes de la muestra (matriz). (Ref. ICH).

Nota. La especificidad puede ser afectada por la presencia de interferentes como precursores de síntesis, impurezas y productos de degradación, entre otros.

En microbiología, especificidad se define como la fracción del número total de cultivos o colonias negativas que son asignados correctamente con el método utilizado. (ISO/TR 13843).

11. **Evidencia objetiva:** Datos que respaldan la existencia o veracidad de algo. (Ref. COGUANOR NGR/ISO 9000:2000).

12. **Exactitud:** Grado de concordancia entre el valor aceptado como un valor verdadero convencional, o un valor de referencia, y el valor encontrado. (Ref. ICH).

Nota: A la exactitud también se le conoce como veracidad.

13. **Exactitud relativa:** Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido. (Ref. G-ENAC-04).

14. **Linealidad:** Capacidad de un método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra, dentro de un rango. (Ref. ICH).

15. **Límite de cuantificación:** Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión aceptable bajo condiciones analíticas específicas. (Ref. ICH).

16. **Límite de detección:** Concentración mínima de analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas. (Ref. ICH).

17. **Método desarrollado por el laboratorio:** Método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollado por el propio laboratorio.

Nota. El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.

18. **Método normalizado:** Método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente. (Ref. ILAC-G18).

Nota. El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.

19. **Método no normalizado:** Método analítico desarrollado por un tercero o que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado. (Ref. ILAC-G18).

Nota. El desarrollo del método, así como su adaptación, incluyen la etapa de su validación.

20. **Muestra blanco:** Material que es similar en matriz y estado físico de preparación a las muestras que están siendo analizadas como muestras problema, pero que no contiene analito nativo, y que es usado con el propósito de monitorizar diferentes aspectos del proceso analítico. Los materiales certificados de referencia constituyen las muestras blanco ideales, pero si no se tienen se usan materiales de referencia no certificados, comerciales o preparados en el laboratorio, que estén caracterizados y sean lo más similar posible a la muestra problema en todo, menos en el analito.

Cuando un material blanco se utiliza para la evaluación de recuperación del analito, al agregarle una cantidad conocida de éste y procesarlo exactamente de la misma manera que las muestras problema, se le llama "blanco de campo" previo a la adición y "muestra enriquecida" posterior a la adición.

Cuando un material blanco se procesa de la misma manera que las muestras problema, pero sin agregarle analito, se le llama "blanco de proceso" y se utiliza para determinar los límites de detección y de cuantificación del método. La detección de analito en el "blanco de proceso" puede indicar baja pureza de los reactivos o contaminación del sistema analítico, proveniente de cualquier componente involucrado (cristalería, atmósfera, etc.). Los valores de los límites de detección y de cuantificación son determinados por la señal instrumental de fondo y los interferentes, que juntos constituyen la llamada línea base del instrumento, y por el valor del blanco de proceso. (Refs. Kenkel, IUPAC, Dux).

Nota: A las muestras blanco también se les llama controles negativos.

21. **Muestra de control:** Material de composición conocida usado con el propósito de monitorizar el proceso analítico, que debe ser similar a las muestras que están siendo analizadas como muestras problema, en cuanto a la matriz, el estado físico de preparación y el rango de concentración del analito.

Una muestra control puede ser usada para caracterizar el desempeño del sistema analítico, en cierto momento o a lo largo del tiempo, dada la similitud de composición indicada y el hecho de ser procesada exactamente de la misma manera que las muestras problema. Los materiales de referencia certificados constituyen las muestras de control

ideales, pero si no se tienen se usan materiales de referencia no certificados, comerciales o preparados en el laboratorio, que estén caracterizados y sean lo más similar posible a la muestra problema.

En el caso que la administración del laboratorio introduzca una muestra control cuya identidad sea conocida por el analista, y éste desconozca su composición, se le llama muestra ciega. Cuando adicionalmente el analista desconoce la identidad de la muestra control, a ésta se le llama doble ciega. (Refs. Kenkel, IUPAC, Garfield).

Nota: A las muestras control también se les llama muestras de evaluación del desempeño, controles positivos o simplemente controles.

22. **Parámetros de desempeño del método:** Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen exactitud, exactitud relativa, desviación, desviación positiva, desviación negativa, efecto matricial, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, sensibilidad, robustez y fortaleza (*ruggedness*), y otras características relacionadas con los resultados obtenibles por el método. (Refs. IUPAC, EURACHEM).

Nota: Dicho de otra forma, son las propiedades, características o parámetros de validación del método (especificaciones del método).

23. **Precisión:** Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas. La precisión puede ser considerada a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. (Ref. ICH). **Nota:** Dicho de otra forma, es la distribución de los valores analíticos alrededor de la media, que puede ser expresada en términos de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación (parámetros de dispersión).

24. **Precisión intermedia:** Medida de la precisión de los resultados de un método de ensayo en condiciones diferentes de analista/observador, día, equipo y lote de reactivos, dentro del mismo laboratorio. (Ref. ICH). **Procedimiento de ensayo:** Forma en que se realiza el análisis; debe describir en detalle los pasos necesarios para realizar el ensayo. Puede incluir, pero no estar limitado a lo siguiente: características de la muestra, preparación de las soluciones de referencia y soluciones de trabajo, uso de los equipos, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para los cálculos, etc. (Ref. ICH).

Nota: El término también se usa para referirse al documento que contiene la descripción arriba indicada.

26. **Rango:** Intervalo entre el valor máximo y mínimo de la concentración del analito / el parámetro de la muestra, para el cual ha sido demostrado que el nivel de precisión, exactitud y linealidad del método de análisis es adecuado. (Ref. ICH).

27. **Repetibilidad:** Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mesurando, realizadas en las mismas condiciones de medición. (Ref. VIM).

Nota. Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento, analista/observador, ubicación, instrumento y condiciones de medición. Por mediciones sucesivas se entiende aquellas mediciones repetidas dentro de un corto período de tiempo.

La repetibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación). A la repetibilidad también se le conoce como precisión intraensayos o intracalibraciones.

28. **Reproducibilidad:** Grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mesurando realizadas en diferentes condiciones de medición. (Ref. VIM).

Nota: Una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen los cambios en las condiciones del análisis o calibración. Estos cambios pueden incluir: el principio en que se basa la medición, el método, analista/observador e instrumento, material y patrones de referencia, ubicación, condiciones de uso y tiempo. La reproducibilidad puede ser expresada cuantitativamente en términos de los parámetros de dispersión de los resultados (desviación estándar, varianza, coeficiente de variación).

29. **Requisito:** Necesidad o expectativa establecida, generalmente implícita u obligatoria. (Ref. COGUANOR NGR/ISO 9000:2000).

Nota 1: “generalmente implícita” significa que es habitual o una práctica común para la organización, sus clientes y otras partes interesadas que la necesidad o expectativa bajo consideración esté implícita.

Nota 2: pueden utilizarse calificativos para identificar un tipo específico de requisito, por ejemplo, requisito de un producto, requisito de la gestión de la calidad, requisito del cliente.

Nota 3: un requisito especificado, es aquel que se declara, por ejemplo, en un documento.

Nota 4: los requisitos pueden ser generados por las diferentes partes interesadas.

30. **Resistencia o fortaleza** (*Ruggedness*): Estabilidad del resultado producido cuando hay variaciones en los pasos del método. Se expresa normalmente como la falta de influencia de variables operacionales y ambientales en los resultados del método analítico. Es una medición de reproducibilidad de los resultados, bajo la variación de condiciones normalmente expresadas de laboratorio a laboratorio y de analista a analista. (Ref. USP/NF).

Nota: Este parámetro es especialmente importante para métodos que van a ser propuestos como métodos normalizados o de referencia.

En algunas disciplinas es considerado sinónimo de Robustez (*Robustness*). (Ref. CITAC/ EURACHEM).

31. **Robustez** (*Robustness*): Capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales. (Ref. ICH).

Nota: En algunas disciplinas es considerado sinónimo de Resistencia o fortaleza (*Ruggedness*). (Ref. CITAC/EURACHEM).

32. **Selectividad:** Capacidad de un método de detectar simultáneamente o separadamente analitos diferentes presentes en una misma muestra. (Ref. USP/NF). **Sensibilidad:**

Cambio de la respuesta del sistema de medición dividido por el cambio correspondiente en el estímulo. (Ref. VIM).

Nota 1: Estímulo se define como la señal que ingresa a un sistema de medición, y respuesta, como la señal que sale de éste.

Nota 2: Dicho de otra forma, la sensibilidad corresponde a la pendiente de la curva de calibración. En algunas disciplinas y para aplicaciones como los ensayos de tamizaje, el término de sensibilidad se refiere al concepto aquí definido como límite de detección.

Nota 3: En microbiología, sensibilidad se define como la fracción del número total de cultivos o colonias positivos que son asignados correctamente con el método utilizado (ISO/TR 13843).

34. **Validación:** Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista. (Ref. COGUANOR NGR/ISO 9000:2000).

La validación de un método analítico es el proceso de establecer los parámetros y las limitaciones de desempeño del método, así como de identificar los factores que pueden influir en el cambio de dichos parámetros y limitaciones; permite demostrar que el método es adecuado para el propósito, esto es, para resolver un problema analítico particular. (Ref. EURACHEM).

Nota: El término "validado" es usado para designar el *status* correspondiente.

35. **Verificación:** Confirmación mediante la aportación de pruebas objetivas, de que se han cumplido los requisitos especificados. (Ref. COGUANOR NGR/ISO 9000:2000).

En el caso de metodología para análisis (o calibración), la verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación. La verificación es una práctica que se debe realizar de manera regular como parte del proceso de aseguramiento de la calidad.

Nota 1: El término "verificado" se utiliza para designar el *status* correspondiente.

Nota 2: La confirmación puede comprender acciones tales como:

- La elaboración de cálculos alternativos
- La comparación de una especificación de un diseño nuevo con una especificación de un diseño similar aprobado.
- La realización de ensayos/pruebas y demostraciones, y
- La revisión de los documentos antes de su liberación.

Anexo 2

Fundamentos y aplicaciones

1 Validación de métodos

1.1 Para los análisis químicos

De acuerdo con EURACHEM/CITAC, en un caso ideal, la validación de un método para análisis químico cuantitativo debería incluir las siguientes actividades y parámetros de desempeño.

- La evaluación de la selectividad y la especificidad, para asegurar que el método responde a la especie particular de interés y no a especies similares a ella. (Esto también aplica al análisis químico cualitativo).
- La evaluación por medio de un material de referencia certificado, para demostrar que el método no da lugar a desviaciones significativas en comparación con resultados trazables obtenidos de manera independiente.
- Evaluaciones de posibles efectos particulares, adicionales a los considerados en las especificaciones del método, para justificar que no es necesario incluir otros efectos.
- Estudios de precisión dentro de un intervalo de tiempo y un set de condiciones tan amplios como sea razonablemente posible, para demostrar que no existen otros efectos significativos no sospechados. (Esto también aplica al análisis químico cualitativo).
- Estudios adicionales sobre posibles fuentes específicas de desviación, incluyendo estudios de enriquecimiento y recuperación, posibles interferencias y reactividad cruzada, para demostrar que no existen efectos adicionales importantes.

Nota: El comportamiento del analito agregado puede no ser equivalente al del analito nativo; por lo tanto, el resultado del estudio de enriquecimiento y recuperación puede dar una indicación equivocada de lo que sería la recuperación del analito nativo.

- La evaluación de la linealidad, para demostrar que el resultado coincide con el valor calculado a partir de la relación entre respuesta y concentración dada por la curva de calibración.
- Frecuentemente se evalúan otros parámetros de desempeño, tales como los límites de detección y cuantificación, para demostrar que el método es adecuado para el propósito. (El límite de detección también aplica al análisis químico cualitativo).
- Las comparaciones entre analistas y entre laboratorios, o con otros métodos, también pueden demostrar posibles deficiencias en el método. Además, éstas pueden aportar evidencia adicional de que los efectos considerados son suficientes para establecer las especificaciones del método.

Es importante considerar que todos los materiales de referencia a utilizar durante la validación, para la calibración, el control y las pruebas, deben ser trazables. Esto asegura que los estudios de validación sean directamente relevantes para los resultados obtenidos durante el uso rutinario del método.

A la vez, la validación juega un papel clave para poder establecer la trazabilidad de los resultados y, por ello, no es un proceso optativo. Aún cuando se está adoptando un método normalizado, que se sabe fue validado y ampliamente probado, es necesario que en el laboratorio se empiece por verificar que éste funciona acorde a sus especificaciones. Es debido a que los métodos analíticos implican procesos complejos, y que por ello son susceptibles al error humano, que siempre es necesario verificar que el laboratorio puede ejecutarlos correctamente.

La mejor manera de hacer esta verificación es usando un material certificado de referencia. Otra evidencia del funcionamiento correcto del método es la que se puede obtener de los ensayos de aptitud y otros estudios realizados con ese objetivo.

Se debe reconocer que las evaluaciones a realizar para la validación de un método analítico no pueden ser exhaustivas y que existe la posibilidad de que las limitaciones prácticas sean considerables.

1.2 Para los análisis microbiológicos

De acuerdo con ENAC los métodos de análisis microbiológicos cualitativos y cuantitativos deben ser validados estimando, cuando sea apropiado, los parámetros de desempeño que se indican en el cuadro siguiente, utilizando métodos estadísticos apropiados.

| Propósito del Ensayo/ Parámetros del Método | Análisis Cualitativo | Análisis Cuantitativo |
|--|-----------------------------|------------------------------|
| Exactitud relativa | + | + |
| Repetibilidad | + | + |
| Reproducibilidad | + | + |
| Sensibilidad | - | + |
| Desviación positiva | + | + |
| Desviación negativa | + | + |
| Especificidad | + | + |
| Límite de detección | + | - |
| Límite de cuantificación | - | + |
| Efecto matricial | + | + |

NOTA:

(-) Significa que este parámetro normalmente no se evalúa.

(+) Significa que este parámetro normalmente se evalúa.

1.3 Para las pruebas rápidas

Para los análisis cualitativos que detectan metabolitos, drogas, microorganismos, hormonas y otros, en fluidos corporales, aguas, alimentos, etc., por medio de pruebas rápidas (tales como ensayos inmunocromatográficos tipo cassette, aglutinación, etc.), se deben aplicar los mismos criterios de validación que los especificados en las pruebas convencionales.

Para la verificación del desempeño del método en uso, como mínimo se debe determinar la sensibilidad (límite de detección), especificidad (detección inequívoca) y los otros parámetros de desempeño declarados por el fabricante de la prueba y los requeridos por las normas.

Es importante mencionar que entre las pruebas rápidas, algunas son empleadas exclusivamente para tamizaje o discriminación, por lo que los resultados positivos requieren de un análisis confirmatorio posterior, cuyo principio metodológico sea diferente.

1.4 Para los análisis automatizados

En el caso de utilizar pruebas normalizadas o validadas por el fabricante del equipo automatizado, el laboratorio deberá proceder a una verificación de la metodología.

El laboratorio que emplee equipo automatizado deberá comprobar la calibración del mismo al momento de su instalación y que ésta cumpla con los requerimientos de la casa comercial. Asimismo periódicamente deben emplearse controles comerciales (negativos y positivos) y correrlos como muestras en la rutina del laboratorio; deberá comprobarse que los resultados de los controles analizados se encuentren dentro del rango permisible para el análisis, con el objeto de verificar el buen funcionamiento del equipo. Como parte de la verificación continua del desempeño de los métodos analíticos automatizados, es especialmente recomendable que el laboratorio participe en programas de comparación entre laboratorios.

Según los criterios internacionalmente vigentes para el aseguramiento de la calidad de los resultados de los laboratorios analíticos planteados por ICH (Chan et al), la validación de un método que usa equipo automatizado requiere cualificar el sistema de hardware y software correspondiente y así establecer su capacidad y confiabilidad de funcionamiento bajo las condiciones adecuadas de uso. La cualificación del sistema se simplifica si los fabricantes y proveedores de los equipos cumplen con la norma ISO 9001; el proceso de cualificación debe abarcar las etapas de instalación, operación y desempeño del sistema.

El laboratorio debe contar con un procedimiento documentado de cualificación que contenga, entre otros componentes, las pruebas a realizar, los correspondientes criterios de aceptación y los formatos para el registro de datos y resultados. La cualificación de instalación permite establecer si el sistema recibido cumple con las especificaciones de fabricación y fue debidamente instalado. La cualificación de operación permite establecer si, al quedar instalado el sistema integrado, o sus módulos, están funcionando de acuerdo con las especificaciones operacionales del caso; se lleva a cabo haciendo pruebas con analitos en muestras específicas para ello. Y, por último, la cualificación de desempeño permite demostrar si el sistema cumple con los requisitos definidos acorde a las necesidades del usuario; ésta se puede llevar a cabo corriendo las aplicaciones analíticas de particular interés para el usuario.

2 Evaluación de los parámetros de desempeño del método

(Adicionalmente a la información que se presenta a continuación se sugiere consultar las "Quick references" incluidas en la sección 6.e de la versión de internet de la Guía de EURACHEM titulada "The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics", dada dentro de las Referencias del presente documento.)

2.1 Análisis de productos farmacéuticos y afines

En el siguiente cuadro (Brown, et al.), se muestran los parámetros de desempeño que FDA, ICH y USP recomiendan incluir en la validación y/o verificación de diferentes métodos de ensayo para productos farmacéuticos y afines (cosméticos, productos higiénicos y odontológicos, dispositivos médicos, etc.), según el propósito del ensayo. La misma metodología puede ser utilizada para varios propósitos, por lo cual se deberá hacer una validación para cada caso.

| Propósito del Ensayo/ Parámetros del Método | Identificación del analito | Determinación de impurezas y compuestos de degradación | | Ensayo de Medición Disolución, Contenido/Potencia | Ensayos Específicos (ingredientes activos y preservantes) |
|--|----------------------------|--|--------------------------|--|---|
| | | Cuantificación | Determinación del límite | | |
| Exactitud | - | + | - | + | + ⁴ |
| Precisión - Repetibilidad | - | + | - | + | + ⁴ |
| Precisión – Precisión Intermedia | - | + ¹ | - | + ¹ | + ⁴ |
| Especificidad | + ² | + | + | + ⁵ | + ⁴ |
| Límite de detección | - | - ³ | + | - | - |
| Límite de cuantificación | - | + | - | - | - |
| Linealidad | - | + | - | + | - |
| Rango | - | + | - | + | - |
| Robustez | - | + | - ³ | + | + ⁴ |

NOTA:

- (-) Significa que este parámetro normalmente no se evalúa.
- (+) Significa que este parámetro normalmente se evalúa.
- (1) En casos en los que se ha evaluado la reproducibilidad, no es necesaria la precisión intermedia.
- (2) La falta de especificidad para un procedimiento analítico puede ser compensada agregándole un segundo procedimiento analítico.
- (3) Puede ser necesario en algunos casos.
- (4) Puede no ser necesario en algunos casos.
- (5) La falta de especificidad para un ensayo para liberar puede ser compensado por la determinación de impurezas.

A continuación se describen los diferentes tipos de ensayo para productos farmacéuticos y afines que se presentaron en el cuadro anterior.

- **Identificación del analito:** Aquellas pruebas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra (Análisis cualitativo). Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.
- **Determinación de impurezas:** Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado. Cualquiera de los dos pretende reflejar las características de pureza de la muestra.
- **Ensayo de medición:** Constituyen procedimientos de ensayo que miden propiedades del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución.
- **Ensayos específicos:** Constituyen procedimientos químicos o microbiológicos que cuantifican el (los) analito(s) presente(s) en una muestra determinada; esto incluye el análisis de materias primas y producto terminado en cuanto a ingredientes activos, preservantes y otros componentes principales.

Para evaluar cada uno de los parámetros de desempeño del método se debe considerar el procedimiento, la documentación y los criterios de aceptación involucrados. A continuación, se incluye como ejemplo, el proceso de evaluación de los parámetros de desempeño de métodos para análisis de productos farmacéuticos, según FDA e ICH (Johnson, Van Buskirk).

2.1.1 Exactitud

- **Procedimiento**

Preparar muestras en un rango que contenga al menos cinco concentraciones diferentes del analito, las cuales aproximadamente estén espaciadas entre 50% (concentración más baja) y 150% (concentración más alta) del rango de trabajo esperado. Usar por lo menos seis réplicas por concentración. Analizar muestras de acuerdo al método en cuestión, usando la matriz del producto o la matriz de la muestra ambiental.

- **Documentación**

Para cada muestra, reportar el valor teórico, el valor del ensayo y el porcentaje de recuperación. Calcular el promedio, la desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el porcentaje de recuperación para todas las muestras. Llevar un

registro de los resultados en una hoja de datos. Cuando sea imposible o difícil de preparar los placebos conocidos, usar el estándar conocido de baja concentración.

- **Criterio de Aceptación**

El porcentaje de recuperación puede estar entre el 90 y 110% del valor teórico para productos no regulados. Una recomendación es usar ± 4 veces la desviación estándar relativa de una tabla. Para la industria farmacéutica de los Estados Unidos, 98 a 102% es típico para un ensayo de principio activo en un producto medicinal. El porcentaje de recuperación puede estar entre 50 y 150% del valor teórico para los métodos usados en productos EPA. Los porcentajes de recuperación menores pueden ser aceptables basados en la necesidad del método.

2.1.2 Repetibilidad

- **Procedimiento**

Hay dos posibles procedimientos a seguir para determinar la precisión intraensayo, o repetibilidad, trabajando con submuestras de una misma muestra homogénea, bajo las mismas condiciones de operación a lo largo de un intervalo corto de tiempo:

- ❖ hacer un mínimo de 9 determinaciones que cubran el intervalo especificado para el análisis, esto es, 3 réplicas a cada una de 3 concentraciones diferentes
- ❖ hacer un mínimo de 6 determinaciones a una concentración que corresponda con la de la muestra problema

- **Documentación**

Registrar los resultados en el formato de datos, así como los cálculos de la media y el(los) parámetro(s) de dispersión escogido(s) (desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) o intervalo de confianza).

- **Criterio de Aceptación**

Se establece acorde a un valor máximo aceptable para el parámetro de dispersión escogido, según el tipo de análisis y su propósito específico.

2.1.3 Precisión Intermedia

- **Procedimiento**

Se evalúa de acuerdo a un diseño experimental específico que responda a las circunstancias bajo las cuales será utilizado el método y minimice el número de experimentos que se necesite efectuar; dicho diseño puede incluir las variaciones que globalmente se dan de día a día, y las variaciones en analista y en equipo. No es necesario determinar precisión intermedia, cuando se ha determinado reproducibilidad.

- **Documentación**

Registrar los resultados en el formato de datos, así como los cálculos de la media, la desviación estándar, la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el intervalo de confianza.

- **Criterio de Aceptación**

Se espera una variabilidad mayor, que para el caso de la repetibilidad.

2.1.4 Especificidad

- **Procedimiento**

Es la habilidad que muestra un método para distinguir entre un analito e impurezas conocidas, precursores sintéticos, metabolitos, o productos de degradación. Esta se muestra en su resolución hacia estos componentes.

- **Documentación**

Imprimir cromatogramas o datos que muestren la resolución de un método.

- **Criterio de Aceptación**

Los componentes contaminantes no deben interferir con el análisis del analito en cuestión.

2.1.5 Límite de Detección

- **Procedimiento**

Determinar la menor concentración a la que se detecte el analito en la matriz de la muestra.

- **Documentación**

Imprimir el cromatograma o registrar la menor concentración detectable en una hoja de registro.

- **Criterio de Aceptación**

No hay un límite de detección mínimo. Sin embargo, para métodos cromatográficos el límite superior suele ser un valor de al menos tres veces la línea base (o nivel de ruido). Para otros instrumentos puede ser el límite de operación del instrumento, según lo haya establecido el fabricante.

Canadian Health Protection Branch (CHPB) establece una razón de 3:1 entre la señal y el ruido. Algunos analistas calculan la desviación estándar de la señal (o respuesta) de un cierto número de muestras blanco y posteriormente multiplican este número por dos para estimar la señal en el límite de detección. El resultado se verifica analizando al menos 6 muestras en el límite aproximado.

2.1.6 Límite de Cuantificación

- **Procedimiento**

Determinar la menor concentración en la que un analito en la matriz/muestra puede ser determinada con la exactitud y precisión requeridas para el método en particular. Este valor puede ser la menor concentración en la curva del patrón.

- **Documentación**

Imprimir el cromatograma o anotar el dato de la menor concentración cuantificable en la hoja de datos. Proveer datos que demuestren exactitud y precisión requeridas en el criterio de aceptación.

- **Criterio de Aceptación**

El límite de cuantificación para métodos cromatográficos es la concentración que proporciona una razón señal a ruido, con una relación de 10 a 1 y que es menor o igual a 10% de la precisión, o una relación de 20 a 1 y es menor o igual a 5% de la precisión. En el límite de

cuantificación, se deben cumplir los criterios de aceptación de exactitud y linealidad (numerales 2.1.1 y 2.1.7 de esta sección). CHPB establece que el límite de cuantificación es el mejor estimado de una concentración baja, que derive en una desviación estándar relativa de aproximadamente 10%, en, al menos, seis réplicas.

2.1.7 Linealidad

- **Procedimiento**

Preparar soluciones patrón de por lo menos cinco diferentes concentraciones del analito, que estén distribuidas regularmente y que cubran del 50% (concentración más baja) al 150% (concentración más alta) del intervalo de trabajo esperado. Los rangos del 75% al 125% no son atípicos de la industria farmacéutica. Usar por lo menos seis réplicas por concentración. Las soluciones patrón deberían prepararse en la misma matriz utilizada con las muestras, si es posible. Analizar las soluciones patrón conforme el método en cuestión.

- **Documentación**

Registrar los resultados en una hoja de datos. Calcular la media, la desviación estándar y la desviación estándar relativa para cada concentración. Graficar la media que corresponde para cada concentración (eje de las Y) en función de la concentración (eje de las X). Calcular la ecuación de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) Registrar estos cálculos en la hoja de datos. Si el resultado es una no linealidad, determinar la relación curvilínea. Graficar el resultado de cada réplica dividido dentro de su concentración (eje de las Y) en función de la concentración (eje de las X). Al resultado dividido dentro de su concentración se le conoce normalmente como “razón de respuesta”. Si el intercepto en la primera gráfica es significativamente distinto de cero, entonces restar el valor del intercepto de cada resultado y luego dividir el resultado dentro de su concentración.

- **Criterio de Aceptación**

La curva en la primera gráfica debería ser lineal con un coeficiente de determinación (r^2) de por lo menos 0.98. (Nótese que es preferible 0.99). El coeficiente de determinación debe ser menor de 0.99 según las necesidades del método. Todos los valores de la razón de respuesta deben caer dentro de una zona horizontal angosta. Los valores de concentración que queden fuera de esa zona no son aceptables para ser incluidos en el intervalo normal de trabajo. Un sistema de detección con respuesta lineal estable debe dar una razón de respuesta que varíe menos del 1%, por ejemplo, el caso de un detector de ionización en llama en cromatografía de gases. Para una técnica con mayor ruido, donde las variables como el flujo, la temperatura y presión puedan afectar la respuesta, se espera una razón de respuesta más amplia, entre el 1% y 5%, por ejemplo, en el caso de espectrometría de masas con nebulización térmica (*thermospray*).

CHPB establece que el coeficiente de determinación debe ser mayor o igual que 0.097 para principios activos y 0.98 para impurezas.

2.1.8 Rango

- **Procedimiento**

Repasar los resultados de ensayo para todos los componentes requeridos de un método específico.

- **Documentación**

Registrar el rango en la hoja de datos.

- **Criterio de Aceptación**

Determinar el rango de las concentraciones del analito en las cuales la precisión, exactitud y linealidad cumple con su respectivo criterio de aceptación.

2.1.9 Robustez

- **Procedimiento**

La determinación de la capacidad del método para no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en las condiciones de trabajo, se logra al considerar aquellas condiciones que, durante el desarrollo del método, se vio pueden afectar los resultados. El procedimiento es específico para cada caso; por ejemplo, para un método de análisis por cromatografía líquida de alta resolución, se evalúa el efecto de pequeñas variaciones en el tiempo de extracción del analito, durante la preparación de las muestras, y en el pH y la composición de la fase móvil, así como la columna y las condiciones de temperatura y flujo, durante el trabajo cromatográfico; también se evalúa el centrifugar las muestras en vez de filtrarlas, el usar diferentes tipos de filtros y la estabilidad de las soluciones patrón y de muestra.

- **Documentación**

Registrar los resultados y cálculos de la media y el parámetro de dispersión escogido (desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) o intervalos de confianza) de cada una de las evaluaciones realizadas, al variar condiciones. El resultado que se informa para cada evaluación de cambio de condiciones es la diferencia de la media obtenida bajo una y otra condición, acompañada de su significancia estadística; lo mismo, para la diferencia en el parámetro de dispersión escogido.

- **Criterio de Aceptación**

Según el tipo de análisis y su propósito específico, se establece un criterio acorde a un valor máximo aceptable para la diferencia entre medias de cada evaluación, a un nivel de probabilidad estadística dado; lo mismo para el parámetro de dispersión escogido

2.1.10 Reproducibilidad

- **Procedimiento**

Se determina en los casos en que se quiere normalizar un método, para transferirlo de un laboratorio a otro o para incluirlo en una farmacopea, y por ello se necesita conocer la precisión entre laboratorios. En el caso más común, que es el de la transferencia directa del método, del laboratorio de origen al laboratorio destino, ambos laboratorios deben analizar el mismo lote de muestras homogéneas trabajando bajo el mismo diseño experimental.

- **Documentación**

El diseño experimental y procedimiento detallado deben ser documentados en un protocolo. Lo mismo aplica a los resultados y cálculos de la media y del parámetro de dispersión

escogido (desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) o intervalo de confianza) de cada uno de los dos laboratorios. El resultado que se informa es la diferencia entre la media obtenida por el laboratorio destino y la media obtenida por el laboratorio de origen, acompañada de su significancia estadística; lo mismo, para la diferencia en el parámetro de dispersión escogido.

- **Criterio de Aceptación**

Según el tipo de análisis y su propósito específico, se establece un criterio acorde a un valor máximo aceptable para la diferencia entre las medias de los dos laboratorios, a un nivel de probabilidad estadística dado; lo mismo para el parámetro de dispersión escogido.

2.1.11 Otros Parámetros Relacionados con Precisión

En una versión anterior, ICH en vez de considerar los parámetros de repetibilidad y precisión intermedia, se refería a la precisión del sistema y la precisión del método; y, adicionalmente, tomaba en cuenta la repetibilidad y reproducibilidad con dos operadores (R&R). Dichos parámetros de desempeño continúan en uso en algunas otras disciplinas.

2.2 Análisis químico de aguas y aguas residuales

En el siguiente cuadro se presentan los parámetros de desempeño que especifican la American Public Health Association (APHA), la American Waterworks Association (AWWA), y la Water Environment Federation (WEF) en su publicación Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition 1998, para la verificación de métodos químicos normalizados para agua.

Según APHA, AWWA & WEF, los métodos modificados o desarrollados por el laboratorio deben ser validados. Para la validación, además de los parámetros y actividades descritas para la verificación de métodos se debe realizar un proceso que se detalla más adelante y que comprende la determinación de la precisión del método y la desviación de un único analista, el análisis de muestras patrón de concentraciones desconocidas para el analista y la determinación de la resistencia o fortaleza (ruggedness) del método.

| Propósito del Ensayo/ Parámetros del Método y Actividades | Verificación (*) | Validación (caso de métodos desarrollados o modificados) |
|--|-------------------------|---|
| Repetibilidad | + | + |
| Reproducibilidad | + | + |
| Controles | + | + |
| Participación en intercomparaciones | + | + |
| Intervalo de trabajo | - | + |
| Linealidad | - | + |
| Recuperación | + | + |
| Límite de detección | + | + |
| Límite de Cuantificación | + | + |
| Robustez | - | + |
| Especificidad | - | + |
| Selectividad | - | + |
| Exactitud (empleo de material certificado) | + | + |

NOTA:

(-) Significa que este parámetro normalmente no se evalúa.

(+) Significa que este parámetro normalmente se evalúa.

(*) La verificación de los métodos normalizados se debe realizar según lo establece el control de calidad del método. Cuando el método no detalla los parámetros de desempeño se recomienda evaluar como mínimo los que se indican en el cuadro. Además del uso de controles internos, se recomienda la participación en intercomparaciones.

Según APHA, AWWA y WEF se requieren las siguientes tres etapas para el proceso de validación de un método, se trate de uno completamente nuevo o de la modificación de un método ya existente: determinación de la precisión y desviación (bias) de un único analista, análisis de muestras desconocidas preparadas en forma independiente y determinación de la fortaleza del método (ruggedness). A continuación se describen las tres etapas antes mencionadas.

Determinación de la precisión y desviación (bias) de un único analista

Para determinar las características de un operador se requiere la determinación de la desviación del método (el error sistemático), y la precisión del operador, (el error al azar introducido al usar el método). Para hacer estas determinaciones se deben analizar al menos siete, preferiblemente diez o más, porciones de un patrón a varias concentraciones, en cada matriz que vaya a ser utilizada. Se trabaja entre dos concentraciones, una que corresponde al límite de detección, o levemente arriba de éste, y otra relativamente mayor, para poder especificar el rango de concentración para el cual aplica el método.

El uso de varias concentraciones para determinar la desviación y precisión puede revelar la relación existente entre estas características del método y la concentración de la sustancia, la toxicidad característica de la sustancia o el factor biológico de interés. Esta relación puede ser constante, lineal o curvilínea, y es una característica significativa del método que debe ser explicada claramente.

Análisis de muestras desconocidas (Control Ciego)

Este paso en el procedimiento de validación de métodos requiere el análisis de patrones preparados en forma independiente donde el valor es desconocido para el analista, siguiendo el procedimiento estándar de operación para el método. El valor medio resultante del análisis de réplicas (repeticiones) de estos patrones debería estar entre tres desviaciones estándar (3s) del valor medio del patrón, pero preferiblemente entre 2s.

Estos patrones de concentración desconocida pueden ser preparados por diferente personal del mismo laboratorio, utilizando reactivos de grado analítico o patrones del National Institute for Standards and Technology, USA (NIST). Si están disponibles para el constituyente específico, es útil el empleo de muestras para evaluación del desempeño que se pueden obtener de U.S. Environmental Protection Agency - Cincinnati (US-EPA).

Resistencia o fortaleza (Ruggedness) del Método

Un ensayo para resistencia o fortaleza del método, es decir, la estabilidad del resultado producido cuando los pasos del método se varían, es el último paso de la validación. Este parámetro es especialmente importante para métodos que van a ser propuestos como métodos normalizados o de referencia. Un ensayo de resistencia o fortaleza conducido apropiadamente nos va a mostrar aquellos pasos en el procedimiento en los cuales el rigor es crítico y aquellos en los que ciertas libertades son permisibles.

La Association of Official Analytical Chemists (AOAC) ha sugerido un método para este ensayo en el que ocho análisis separados se pueden usar para determinar el efecto de variar siete diferentes pasos en el procedimiento analítico, según detalle aquí no incluido.

Después de que un método nuevo ha sido validado por los pasos indicados anteriormente, podría ser prudente ensayarlo para verificar su equivalencia con métodos normalizados, a menos que no existan. Esto requiere el análisis de un mínimo de tres concentraciones por el método nuevo y por el método normalizado.

Si el rango de concentración es muy amplio, se deberían analizar otros niveles de concentración. Una vez realizada una serie inicial de análisis (5 ó más) a cada concentración escogida, se aplican los procedimientos estadísticos indicados a continuación:

1. Evaluar si la distribución de los datos es normal y transformarlos, si es necesario.
2. Seleccionar un tamaño apropiado de muestra basado en el valor estimado de la desviación estándar.
3. Analizar las varianzas de los dos métodos utilizando la prueba F.
4. Analizar los valores medios de los dos métodos utilizando la prueba t-Student.

Debido a que el número de análisis puede ser muy grande, los cálculos son complejos y es necesario estar familiarizado con la estadística básica.

US-EPA cuenta con un listado de métodos normalizados, de referencia y equivalentes para el análisis de agua (Guidelines Establishing Test Procedures for Analysis of Pollutants under the Clean Water Act. Final Rule. 40 CFR Part 136; Federal Register 59:20:4504).

2.3 Análisis clínicos

El National Committee of Clinical Laboratory Standards, USA (NCCLS) establece los siguientes criterios para la validación técnica y fisiopatológica de los análisis clínicos.

2.3.1 Validación técnica

• Especificidad

- La especificidad analítica es la capacidad que tiene un procedimiento de medición de producir una señal que sólo se relaciona con la presencia de la cantidad del analito que se investiga, independiente de la composición de la matriz.
- Debe calcularse con base en series de muestras control negativas provenientes de personas sanas preclasificadas o de origen comercial. Representa el porcentaje de muestras verdaderamente negativas, o con ausencia del analito.
- La especificidad se puede estudiar agregando a la muestra algunas sustancias que se sospecha que reaccionan de la misma manera que el componente estudiado y comparar estadísticamente los resultados analíticos con y sin agregado; este tipo de muestra control también se conoce como control negativo.
- La presencia en la muestra de componentes que produzcan inespecificidad, conduce a errores sistemáticos.

• Sensibilidad

- La sensibilidad representa la menor concentración detectable o medible. Esto es importante, ya que determina los límites de detección y cuantificación, influyendo en la capacidad de determinar cualitativa y cuantitativamente el analito y diferenciar los resultados positivos y negativos.
- La sensibilidad debe calcularse con base en muestras positivas preclasificadas y representa el porcentaje de muestras que verdaderamente resultaron positivas.
- La sensibilidad permite diferenciar entre situaciones clínicas como enfermedad y salud, o entre dos o más enfermedades.

2.3.2 Validación fisiopatológica

Las siguientes características tienen la capacidad de diferenciar entre dos situaciones clínicas (enfermedad y salud, o varias enfermedades). Es importante el empleo de poblaciones con

resultados desconocidos, utilizando paralelamente un método de referencia, garantizando la imparcialidad de la interpretación de los resultados, es decir, evitando sesgos o tendencias a resultados previamente conocidos.

- **Sensibilidad Nosográfica**

Es la capacidad de un procedimiento de medición de indicar que una enfermedad existe, o sea, la probabilidad de que un individuo afectado por la enfermedad obtenga un resultado positivo.

- **Especificidad Nosográfica**

Es la capacidad de un procedimiento de indicar la ausencia de enfermedad cuando no existe, es decir la probabilidad de que un individuo que no tiene la enfermedad obtenga un resultado negativo.

- **Valor Predictivo de un resultado positivo**

La probabilidad de que un individuo con un resultado positivo o disminuido realmente esté enfermo.

- **Valor predictivo de un resultado negativo**

La probabilidad de que un individuo con un resultado negativo, realmente esté sano.

Para evaluar estas características, las observaciones individuales se ordenan;

| | Enfermedad Presente | Enfermedad Ausente |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Resultado Positivo | A Verdadero Positivo | B Falso Positivo |
| Resultado Negativo | C Falso negativo | D Verdadero negativo |

Los cálculos se hacen con las siguientes fórmulas:

$$\text{Sensibilidad nosográfica (Sn)} = A/(A + C)$$

$$\text{Especificidad nosográfica (Sp)} = D/(D + B)$$

$$\text{Valor Predictivo de un resultado positivo} = A/(A+B)$$

$$\text{Valor Predictivo de un resultado negativo} = D/(C+D)$$

El valor predictivo de un resultado positivo y de un resultado negativo dependen de la sensibilidad y la especificidad nosográfica del procedimiento y de la prevalencia de la enfermedad (frecuencia de cierta enfermedad en la población de interés en un lapso de tiempo dado).

El valor predictivo de un resultado positivo aumenta en forma importante en una población en la que la prevalencia de la enfermedad sea muy alta. El valor predictivo de un resultado negativo aumenta cuando la prevalencia disminuye.