

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 1 de 22

1. Objeto

Determinar los parámetros de eficacia de un método normalizado, nuevo o modificado, con el fin de documentar la capacidad de desempeño del método.

2. Alcance

Aplica para realizar la validación y verificación de métodos analíticos de acuerdo con lo establecido en el Centro de Calidad de Aguas.

3. Referencias Normativas.

- American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. STANDARD METHODS: For the Examination of Water and Wastewater, 23RD Edition, American Public Health Association 800 I Street, NW. Washington D.C., 2017. ISBN 978-087553-287-5.
- Environmental Protection Agency. Definition and Procedure for the determination of the method detection limit. Appendix B to Part 136. Revisión 1.11. 1996.
- Guidelines for Quality Management in Soil and Plant Laboratories. (FAO Soils Bulletin - 74). L.P. van Reeuwijk, V.J.G. Houba INTERNATIONAL SOIL REFERENCE AND INFORMATION CENTRE. Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO. Rome, 1998.
- Method Validation. Environmental Technology Centre (ETC). SOP No.2.5/2.2/S. October 23, 2001. Ottawa, Canada.
- Miller James; Miller, Jane. Estadística y quimiometría para química analítica, 4 edición. Prentice Hall, 2000. pág. 53-55; 264-265.
- Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales - IDEAM. Estandarización De Métodos Analíticos. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Bogotá, 2006.
- Instituto de salud pública. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Santiago de Chile, 2010.
- Instructivo General de Validación y Verificación de métodos. Gestión de Tecnología de Negocio. Centro de Innovación y Tecnología. Departamento de Servicio Técnico de Laboratorio de Transporte y Transversales. Laboratorio de Aguas y Suelos. Instituto Colombiano del Petróleo.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2011. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. OECD guidelines for the testing of chemicals N° 201.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2004. Daphnia sp., acute immobilization test. OECD guidelines for the testing of chemicals N° 202.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 1992. Guidelines for the testing of chemicals Fish, Acute Toxicity Test.
- USEPA. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms. Fifth Edition. Office of Water, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 20460.

4. Definiciones.

- Declaración de la aplicabilidad del método:** incluye los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse satisfactoriamente un método de análisis, con el fin de determinar su conformidad con una norma.
- Exactitud:** se define como la cercanía entre el valor observado y el valor conocido (verdadero o aceptado como referencia). Esta diferencia constituye el error sistemático del método. La exactitud del método se determina usando material de referencia cuando esté disponible. La concentración del material de referencia usado en la determinación de la exactitud (veracidad), debe estar por encima del límite de detección del método.
- Informe de validación:** documento en el cual se indican las pruebas o parámetros de validación aplicados, y el diseño experimental desarrollado con base en los requerimientos del método.
- Límite de Cuantificación del Método:** es la concentración de analito que produce una señal suficientemente mayor que el blanco que puede ser detectada dentro de los niveles especificados por las buenas prácticas de laboratorio, durante las condiciones de operación de rutina (dando lugar a una respuesta reproducible). Típicamente es la concentración que produce una señal 10 s (s = desviación estándar) sobre la señal del blanco de agua reactivo.
- Límite de Detección del Método:** es la mínima concentración de una sustancia que puede ser medida y

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 2 de 22

reportada con un 99% de confianza de que la concentración del analito es mayor que el blanco, y es determinado del análisis de una muestra en una matriz dada conteniendo el analito.

- **Límite máximo permitido (LMP):** nivel máximo o tolerancia establecida para un analito en una reglamentación ambiental.
- **Linealidad:** la linealidad de un método analítico es su capacidad de obtener resultados que sean, directamente o mediante transformaciones matemáticas definidas, proporcionales a las concentraciones de analitos en las muestras, dentro de un determinado rango.
- **Matriz:** es el tipo de sustancia compuesta (líquida, sólida, gaseosa) que puede o no contener al analito de interés.
- **Método de ensayo confirmado:** método de ensayo normalizado y aceptado, para el que se han llevado a cabo estudios de verificación del desempeño, con el fin de determinar su precisión y fiabilidad para un propósito específico.
- **Método de ensayo validado:** método de ensayo aceptado, para el que se han llevado a cabo estudios de validación (desempeño) con el fin de determinar su precisión y fiabilidad para un propósito específico.
- **Método normalizado:** método apropiado para el ensayo dentro de su alcance, publicado por Organismos de normalización internacional, nacional o regional (ISO, EN, ASTM, BS, DIN, etc.), o por organizaciones reconocidas en diferentes ámbitos (AOAC, FIL-IDF, EPA, USP etc).
- **Precisión Intermedia (de medida):** hace referencia a veces a la reproducibilidad dentro del laboratorio (intralaboratorio), variación entre series de medida, variación entre lotes o variación inter-ensayo. La precisión intermedia ofrece una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad. El objetivo es obtener una estimación de la precisión que refleje todas las fuentes de variación que se producirán en un solo laboratorio en condiciones de rutina (diferentes analistas, períodos de tiempo prolongado, diferentes equipos, entre otros).
- **Precisión:** está definida como el grado de acercamiento entre los datos generados de medidas repetitivas bajo condiciones especificadas. La desviación estándar se usa para expresar la precisión del método. Se recomienda usar una serie de muestras con una concentración al menos diez (10) veces el límite de detección del método para calcular la precisión. Si se requiere, la precisión del método puede determinarse a diferentes concentraciones del analito o en diferentes matrices.
- **Rango:** es el intervalo entre los niveles superior e inferior de una serie de mediciones (incluyendo estos niveles).
- **Repetibilidad:** se refiere a pruebas desarrolladas bajo condiciones lo más constantes posibles y durante un intervalo corto de tiempo (resultados de pruebas independientes obtenidos con el mismo método, con la misma muestra, en el mismo laboratorio, con el mismo equipo y realizados por el mismo operador).
- **Reproducibilidad interlaboratorio:** En validación, la reproducibilidad se refiere a la variación entre laboratorios utilizando el mismo método. También puede referirse a la variación observada entre laboratorios utilizando diferentes métodos, pero con la intención de medir la misma magnitud.
- **Reproducibilidad:** es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros.
- **Robustez:** es la medida de la capacidad del método de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método, y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.
- **Selectividad:** el término selectivo se refiere a un método que proporciona respuestas para un número de compuestos químicos que pueden o no distinguirse, o como la capacidad para medir con exactitud un analito en presencia de interferencias. Las interferencias varían dependiendo de la técnica empleada. Pueden ser: ionización de los compuestos en las técnicas de espectrofotometría de llama (Absorción Atómica), la cual puede ser suprimida por adición de un exceso de un elemento fácilmente ionizable, o en técnicas cromatográficas (GC, HPLC) la selectividad se obtiene eligiendo columnas y condiciones cromatográficas óptimas (composición de la fase móvil, temperatura de la columna, longitud de onda del detector, etc).
- **Validación:** verificación de determinados parámetros de un método en la que los requisitos especificados para estos, demuestran que el método es idóneo para un uso previsto.
- **Veracidad:** determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados, y un valor de referencia aceptado.
- **Verificación:** suministro de prueba(s) objetiva(s) de que un método analítico determinado satisface el (los) requisito(s) especificado(s).

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 3 de 22

5. Condiciones Generales.

5.1 Análisis fisicoquímicos.

Para los fines de una validación o verificación de un método, se utilizan normalmente ciertas mediciones estadísticas, que ayudan a establecer si el método se encuentra dentro de los parámetros estadísticos establecidos. Normalmente se determinan los siguientes parámetros estadísticos:

Media: conocida también como media aritmética o promedio, es la cantidad total de la variable (muestra o medida) distribuida en partes iguales entre cada observación. En términos matemáticos, es igual a la suma de todos sus valores dividida entre el número de sumandos:

$$\frac{\sum_n X_i}{n}$$

Dónde:

x_i = valor de una lectura
n = número de lecturas

Desviación estándar (S): es el promedio de la dispersión de los valores obtenidos (lecturas) respecto del promedio.

$$S = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}}{n - 1}$$

Dónde:

x_i = valor de una lectura
X = promedio de la totalidad de lecturas
n = número de lecturas

Coefficiente de Variación (CV): desviación estándar dividida por la media. También es conocida como desviación estándar relativa (RSD). El coeficiente de variación puede ser expresado en porcentaje:

$$\%CV = \frac{s}{\bar{X}} * 100$$

Dónde:

s = desviación estándar de las lecturas
X = promedio de la totalidad de lecturas

Varianza: es una medida de dispersión definida como el cuadrado de la desviación estándar.

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2}{n - 1}$$

Dónde:

x_i = valor de una lectura
X = promedio de la totalidad de lecturas
n = número de lecturas

Recuperación: es la fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada, muestra dopada o adicionada) previa al análisis, que es determinada efectivamente por el método; el porcentaje de recuperación (%R) entre las muestras fortificadas y sin fortificar, se calcula teniendo en cuenta los siguientes criterios:

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 4 de 22

- Cuando en la muestra real el analito de interés se encuentre en una concentración superior al valor mínimo de cuantificación del método, ésta representa una muestra con efecto matriz, ya que el analito está fuertemente ligado a las características de la muestra real. El cálculo aplicado es el siguiente:

$$\%R = \frac{CF - CSF}{CA} \times 100$$

Dónde:

%R: Porcentaje de recuperación

CF: concentración del analito en la muestra fortificada

CFS: concentración del analito medida en la muestra sin fortificar

CA: concentración del analito adicionado a la muestra fortificada

- Cuando en la muestra real el analito de interés se encuentre en una concentración inferior al valor mínimo de cuantificación del método, ésta se considera un blanco de matriz, y por tanto la concentración del analito en la muestra matriz es insignificante para el análisis estadístico. Existen dos formas válidas de evaluar en este tipo de casos la recuperación:
 - ✓ Considerar la CFS = 0, teniendo en cuenta el valor incierto del analito, o
 - ✓ Enriquecer previamente la muestra original (blanco de matriz) en una concentración 1.5 veces la MCC del método, caracterizar siete (7) veces y tomar el valor promedio obtenido como “muestra efecto matriz”, para realizar la posterior fortificación en los rangos establecidos, análisis y cálculo de recuperación.

Error: es el resultado de una medición, menos el valor verdadero.

El porcentaje de error se calcula así:

$$\%E = \frac{(Ct - Ce)}{Ct} \times 100$$

Dónde:

%E: porcentaje de error

Ct: Concentración teórica del estándar de referencia o muestra fortificada

Ce: Concentración experimental del estándar de referencia o muestra fortificada

5.2 Análisis hidrobiológicos.

Las muestras hidrobiológicas generan datos multivariados debido, es decir, una muestra es descrito por múltiples variables (e.d. taxones) que se encuentran independientemente unos de otros estadísticamente. Por esta razón, el uso de estadísticos univariados como las pruebas T o la U de Mann-Whitney no son las idóneas para poder obtener comparaciones entre muestras, a menos que se decida utilizar atributos univariados como la abundancia total o el número de taxones total. Sin embargo, estos atributos no describen completamente la muestra, por ejemplo, se puede tener muestras con la misma cantidad de especies, pero estas pueden ser diferentes, por lo que las estructuras de las comunidades también serían diferentes.

Esta perspectiva aplica inclusive en los métodos utilizados para la validación de los métodos. La repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad de los análisis realizados a los grupos hidrobiológicos se deben visualizar como una muestra con datos multivariados, por tal motivo es necesario utilizar estadística multivariante. Dentro de estas se encuentra los análisis de clasificación, que se basan en agrupar muestras a partir de las similitudes de las variables que lo componen. El objetivo final de este tipo de análisis es agrupar o separar las diferentes muestras determinando qué tan similares son, por lo que el objetivo central que se basan los análisis de validación se puede cumplir.

Existen diferentes tipos de análisis de clasificación, pero el más aceptado para trabajar con datos de abundancia por taxón identificado es el análisis de clasificación jerarquizado de media ponderada basada en el coeficiente de similitud de Bray-Curtis. La base de este análisis es el coeficiente que es el que determina la similitud entre dos

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS		
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022
			Página: 5 de 22

muestras y tiene ventajas de uso, con respecto a otros coeficientes, porque no es afectado por los cambios de unidad de medidas ni si se excluyen o incluyen especies ausentes ni si se incluyen más muestras, y logra inclusive detectar diferencias en la abundancia total, aunque las relativas sean idénticas.

El coeficiente de Bray Curtis (C_{BC}) en términos generales es la sumatoria de la diferencia de abundancia de cada especie sobre la sumatoria de las abundancias de la misma especie.

$$C_{BC} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^p |y_{ij} - y_{ik}|}{\sum_{i=1}^p (y_{ij} + y_{ik})}$$

Dónde:

C_{BC} es coeficiente de Bray Curtis.

j es la muestra uno.

k es la muestra dos.

y es la abundancia de cada taxón identificado en las muestras.

El valor obtenido está entre 0 y 1, siendo completamente diferente la muestra cuando el valor final es cero "0" y completamente igual cuando es "1". Si la muestra es revisada por alícuotas, la escala recomendada para determinar las similitudes de los grupos hidrobiológicos es la siguiente:

- $C_{BC} \leq 0.50$ = no existe repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad.
- $C_{BC} 0.51 - 0.70$ = se presenta repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad, pero se debe realizar un diagnóstico para determinar en dónde están las diferencias.
- $C_{BC} \geq 0.71$ = se confirma completamente la repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad.

Por otro lado, si la muestra es revisada completamente, la escala recomendada es la siguiente:

- $C_{BC} \leq 0.70$ = no existe repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad.
- $C_{BC} 0.71 - 0.90$ = se presenta repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad, pero se debe realizar un diagnóstico para determinar en dónde están las diferencias.
- $C_{BC} \geq 0.91$ = se confirma completamente la repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad.

Estas dos escalas se deben a que se ha demostrado que la variabilidad de una muestra en los grupos biológicos es muy alta cuando se revisa una porción de la muestra. Los grupos biológicos con organismos más pequeños tienden a mostrar una mayor variabilidad. Esta situación se da por la imposibilidad de homogenización perfecta de la muestra para la subdivisión, así como por la proporción de la alícuota con respecto al total de la muestra. Entre los estudios de los grupos hidrobiológicos que el CCA trabaja, se han encontrado variabilidades entre 5% y 60%. Por esta razón, se toma como referencia un valor intermedio entre estas variabilidades, es decir un 30% (equivalente al 0.70 de similitud de Bray-Curtis).

En el caso de no comprobarse la existencia de repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad, el proceso se deberá realizar una segunda vez, y en caso de persistir se deberá proceder a realizar una vez más la prueba y calcular el resultado con el índice de similitud de Jaccard, el cual es más apropiado para muestras donde las comunidades presenten una alta variabilidad tanto riqueza de taxones como en densidad, ya que este estimador se basa en la relación de presencia - ausencia entre el número de taxones comunes en dos eventos (repeticiones) y en el número total de taxones.

El coeficiente o índice de similitud de Jaccard se expresa con la siguiente fórmula:

$$I_j = \frac{c}{a + b - c}$$

Donde:

a = es el número de taxones presentes en el evento A

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 6 de 22

b = es el número de taxones presentes en el evento B
c = es el número de taxones presentes en ambos eventos, A y B.

El valor obtenido está entre 0 y 1, siendo completamente diferente la muestra cuando el valor final es cero "0" y completamente igual cuando es "1". El criterio de aceptación o rechazo que se debe aplicar es el siguiente:

- $I_j \leq 0.50$ = no existe repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad.
- I_j entre 0.51 - 0.70 = se presenta repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad, pero se debe realizar un diagnóstico para determinar en dónde están las diferencias.
- $I_j \geq 0.71$ = se confirma completamente la repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad.

Finalmente, si persiste la ausencia de repetibilidad, precisión intermedia o reproducibilidad, se deberá registrar el valor obtenido y las observaciones de las dificultades obtenidas en el proceso en el formato FO-GAA-232 FORMATO DE REPETIBILIDAD, PRECISIÓN INTERMEDIA Y REPRODUCIBILIDAD PARA COMUNIDADES BIOLÓGICAS.

Si los análisis se realizan con tres o más revisiones por muestra, se debe obtener un promedio con las diferentes similitudes halladas y un coeficiente de variación (CV). Para aceptar la posición en la escala, este CV no debe sobrepasar el 10% cuando la muestra es revisada completamente y 20% si la muestra es revisada por alícuotas. Si este CV es mayor, se debe realizar un diagnóstico para determinar en dónde se encuentran las diferencias.

El diagnóstico es revisar en qué taxones se encontraron las mayores diferencias y por ende, realizar un ajuste para los futuros análisis.

A partir de estas razones, para el análisis de validación (e.d. repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad) de las muestras hidrobiológicas se opta por usar el coeficiente de Bray-Curtis para determinar las similitudes entre las muestras y así considerar si es válido o no el método de análisis de las mismas.

Estos análisis serán realizados por cada analista al comenzar el contrato de trabajo y se realizará al menos tres veces al año para hacer un seguimiento. En cada momento de análisis se escogerá una muestra representativa tanto en abundancia como en número de taxones identificados para realizar la validación. Con respecto a la reproducibilidad, se debe intentar realizar una prueba anual, siempre y cuando se consiga un laboratorio o profesional que presente las condiciones mínimas para poder reproducir los análisis.

5.3 Análisis ecotoxicológicos.

Para estas pruebas se pueden obtener tres parámetros a evaluar, repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad se realizará cada vez que se presenta un nuevo analista, comenzando su contrato y después se realizarán al menos dos pruebas anuales para controles de calidad. La precisión intermedia se realizará una vez cada vez que se cambie el equipo de trabajo; mientras se mantenga el equipo de trabajo, se realizará al menos dos pruebas para controles de calidad. La reproducibilidad se realizará al menos una vez al año, siempre y cuando exista un laboratorio que tengas las características mínimas para poder reproducir el método.

➤ Repetibilidad:

Para poder obtener el parámetro de repetibilidad (validación del analista), se realiza los procedimientos similares a los fisicoquímicos, en donde se obtiene un coeficiente de variación (CV). La diferencia es el límite de la prueba para que sea aceptada positivamente:

Modelo	CV (%)	Determinación	CV (%)	Determinación	CV (%)	Determinación
Algas	0-30	Repetible	31-63	Repetible con diagnóstico.	>63	No repetible
Cladóceros	0-21		21-27		>27	
Peces	0-21		21-27		>27	

Estos límites fueron establecidos a partir de recomendaciones realizadas por la USEPA, basada en un promedio

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS		
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022 Página: 7 de 22

obtenido en interlaboratorios internacionales.

Esta prueba es realizada por un analista que repite las pruebas al menos cinco veces, obteniendo la concentración letal al 50% (LC50) a partir del porcentaje de inhibición para las algas y mortalidad para cladóceros y peces.

Para aceptar el LC50, la regresión debe ser significativa y presentar un coeficiente de correlación igual o mayor a 0.7. En el caso de la significancia, se realiza una prueba Chi cuadrado (χ^2) entre el porcentaje de mortalidad observado ($\%m_o$) y esperado ($\%m_e$).

$$\chi^2 = \sum \frac{(\%m_o - \%m_e)^2}{\%m_e}$$

Para determinar si la regresión es significativa, primero se debe determinar el valor χ^2 de la tabla teniendo en cuenta que los grados de libertad es el número de concentraciones con valores Probit calculados menos uno (n-1) y con un nivel de significancia del 0.10. Este valor debe ser igual o menor al χ^2 calculado para considerar que la regresión si es ajustada y por lo tanto, significativa.

➤ **Precisión intermedia:**

Para poder determinar la precisión intermedia (validación del laboratorio) se utiliza una prueba estadística para comparación de dos muestras independientes a partir de la variabilidad de los datos. Se han escogido la prueba F-Fisher si los datos cumplen los atributos de la estadística paramétrica o la prueba U de Mann-Whitney cuando los datos no cumplen los atributos de la estadística paramétrica. La ventaja de la última es que no requiere que se cumplan los requisitos de normalidad, homocedasticidad y homogeneidad; además de poder realizarse con pocos datos por muestra.

Para ello se debe determinar el estadístico U para cada muestra y esta es comparada bajo un nivel de significancia del 95% ($\alpha = 0.05$).

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Donde n_1 y n_2 son los tamaños de cada muestra; R_1 y R_2 es la suma de rangos de cada muestra.

Esta evaluación se realiza a partir de muestras realizadas por diferentes analistas. Si el laboratorio cuenta solo con un analista, este debe realizar la prueba dos veces, pero cambiando otras condiciones, por ejemplo, horas del día de desarrollo de la prueba; días intermedios entre los análisis, preferiblemente en estos días intermedios realizar otras pruebas diferentes; cambio de cohortes de los organismos; entre otros. Para aceptar que existe precisión intermedia de las pruebas ecotoxicológicas, el valor p del estadístico deberá ser mayor del 5% (valor $p \geq 0.05$).

➤ **Reproducibilidad:**

Para poder determinar la reproducibilidad (validación del método) se utiliza el mismo procedimiento estadístico de la precisión intermedia pero el segundo analista es un profesional externo o un laboratorio diferente al Centro de Calidad de Aguas del ICAOC que deberá realizar los análisis con los métodos propuestos por el CCA. Este procedimiento se hace de esta forma porque no existe una evaluación interlaboratorio en la región con el que se pueda realizar esta validación.

5.4 Análisis microbiológicos.

Las pruebas realizadas en el laboratorio Centro de Calidad de Aguas del ICAOC con respecto al componente microbiológico permiten validarse a partir de la recuperación, repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Los estadísticos utilizados son los mismos descritos para los análisis fisicoquímicos para cada uno de los parámetros. Así mismo, los límites de aceptación son los mismos, es decir, para la repetibilidad el valor debe ser menor al 10%; y para la precisión intermedia la prueba debe presentar un valor-p mayor de 0.05.

Al imprimir este documento se convierte en copia no controlada del SIG y su uso es responsabilidad directa del usuario

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS		
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022 Página: 8 de 22

En el caso de la recuperación, en las mediciones microbiológicas, el analito corresponde a partículas vivas que se evalúan por aproximación mediante la observación de un número de colonias o de la valoración indirecta del crecimiento de los organismos (turbidez, cambios de pH, aparición de gas, formación de subproductos con cambios visibles en el medio, etc) por lo que el método de ensayo no puede conocer la verdadera cantidad de microorganismos en la muestra ya que ésta depende de la viabilidad de estos.

El análisis de validación se realiza en cada una de las diferentes matrices trabajadas en Centro de Calidad de Aguas del ICAOC. La frecuencia de estos procesos está supeditada al personal presente y cantidad de servicios que se realice. Se realizará como mínimo una vez al año cada una de las evaluaciones de validación. Así mismo, cada vez que entre un analista nuevo se realizarán los procesos de validación de repetibilidad.

Los controles están descritos en el instructivo técnico general para el control de calidad de medios de cultivo.

5.4.1 Exactitud en términos del porcentaje de recuperación

Indica la falta de incertidumbre, entre lo observado y los valores verdaderos. Se estima a partir del uso de cultivos de referencia, es expresado en términos de porcentaje de recuperación. Dado que la viabilidad se define por crecimiento, es decir, por el método mismo y es diferente en cada medio de cultivo y tipo de muestra, la recuperación absoluta es indefinible y la trazabilidad es imposible. Por esto, la característica de desempeño es la recuperación relativa del método aun cuando no se conozca el resultado verdadero, es decir, no se tenga la exactitud del método. Los porcentajes de recuperación relativa de los diferentes métodos de ensayos microbiológicos han presentado una media del rango de recuperación entre el 70% al 110%.

$$\%R = \frac{\text{Log}(Mf - M)}{\text{Log}(Cr)} * 100$$

Mf= Concentración de la muestra fortificada con cepa de referencia.

M= Concentración de la muestra sin adición.

Cr= Concentración de la cepa de referencia en inóculo.

5.4.2 Cálculo del Criterio de Precisión (Cartas R)

Idealmente de cada método se debe realizar el análisis de por lo menos 30 datos para evaluaciones microbiológicas o de por lo menos 15 datos para evaluaciones analíticas, tanto para repetibilidad como para reproducibilidad.

Criterio de precisión para métodos microbiológicos

Los pasos que se citan a continuación aplican para el cálculo del criterio de repetibilidad y de reproducibilidad:

1. Calcular el valor de logaritmo natural para ambas réplicas. Si $\ln(\text{Rep}) < 1$ corrija $\ln(\text{Rep})+1$.
2. Calcular el valor del rango correspondiente a las dos réplicas ($\ln(\text{Rep}_1)-\ln(\text{Rep}_2)$)
3. Calcular el valor del promedio (R), desviación estándar y coeficiente de variación a partir de la columna que contiene los valores del rango.
4. Calcular el criterio de precisión empleando:

$$\text{Criterio de precisión} = 3.27 * R$$

Si el Rango del log es < Criterio P, la medición es REPETIBLE/REPRODUCIBLE

5.4.3 Límites de Trabajo

Los límites de trabajo inferiores de los métodos microbiológicos son en gran medida asunto de definición, mientras que los límites superiores se definen mediante los requisitos de espacio y las interacciones resultantes de las

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 9 de 22

colonias microbianas, considerando que un microorganismo para hacerse detectable a simple vista debe multiplicarse aprox. un millón de veces (principio de la unidad formadora de colonia–UFC).

Para establecer el intervalo de trabajo se realiza un diseño experimental con muestras a partir de organismos de referencia adicionados y muestras naturales. Adicionalmente, se corrobora la selectividad, especificidad, sensibilidad y linealidad con muestras naturales para niveles bajos y altos de acuerdo con el intervalo de trabajo típico de los métodos de ensayo.

Los límites de trabajo con organismos de referencia se determinan agotando las muestras por dilución seriada de acuerdo a cada procedimiento técnico hasta una densidad celular que exceda ligeramente el límite superior supuesto del desempeño del detector (6 ó 7 diluciones seriadas) y su posterior siembra en los medios de cultivo respectivos para recuento de acuerdo con los criterios de lectura de los métodos. En aquellos casos que el límite trabajo se realice con muestras naturales se seleccionarán aquellas que por resultados históricos de rutina se encuentren en los niveles alto y bajo del método de ensayo.

Límite de detección

Corresponde a la densidad más baja del microorganismo que puede ser determinada. Se establece usando diluciones de los cultivos de referencia y midiendo la recuperación entre réplicas de cada dilución. Para el método de filtración por membrana el límite de detección es de 1 UFC/100mL, para Coliformes totales, termotolerantes y *E. coli*.

Límite Inferior

El límite estadístico inferior puede expresarse como el recuento “confiable” más bajo por porción analítica o detector (caja de petri o tubo de ensayo, según sea el caso), definiendo la confiabilidad por la mejor precisión. Por esta razón, el límite inferior de cuantificación (determinación) se encuentra alrededor del valor límite de lectura en el sistema detector que se emplee en que el coeficiente de variación en condiciones aleatorias es +/- 25% (Poisson).

En el caso de recuento en placa por siembra en superficie este valor límite de determinación se encuentra alrededor de 15 colonias, en el recuento en placa por siembra en gota alrededor de 3 colonias, en el recuento sobre membranas de filtración alrededor de 20 colonias y en el recuento en medio líquido por dilución seriada en base 10 alrededor de 10 microorganismos.

Además, para el límite de detección, aplicando el criterio de lectura del Standard Methods (Method 9215A-8), si en el elemento detector de todas las diluciones de cualquier muestra no se obtiene crecimiento, se reporta el recuento como < 1 dividido por el menor volumen de muestra trabajado.

En el caso del límite de detección, éste se define en términos de la probabilidad de registrar un resultado positivo con una confiabilidad del 95%, el cual se calcula a partir de la distribución de Poisson así:

$$p (+) = 1 - e^{-m}$$

Dónde:

e es la base de logaritmos naturales

m es el número promedio de organismos por porción analítica

Considerando la probabilidad de detectar el organismo como del 95% [$p(+)= 0.95$], si se toma éste como referencia, entonces $e^{-m} = 1-0.95 = 0.05$, que al solucionar de la ecuación [$m = -\ln(0.05) = 3$] se obtiene que para el recuento promedio de 3, las oportunidades de detectar el microorganismo en una porción de ensayo es igual a 0.95 (siempre que prevalezca la distribución de Poisson).

Límite superior

En los métodos de recuento en placas (medio sólido), la precisión teóricamente mejora de manera constante con el número de colonias observadas en el conjunto de detección y que en condiciones prácticas depende de la

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 10 de 22

situación de ensayo; es decir, que se satura cuando el número de colonias objeto de recuento es sólo una, cuando la sobredispersión de los recuentos paralelos es pronunciada o cuando los recuentos de colonia de diferentes diluciones (volúmenes) no concuerdan. Por esta razón, en cada método de ensayo se define un rango de lectura de datos que asegura que la incertidumbre total se encuentra dentro de los criterios de validez del método.

Aplicando el mismo razonamiento del límite inferior, el límite superior de cuantificación (determinación) se encuentra alrededor del valor límite de lectura en el sistema detector que se emplee en que el coeficiente de variación en condiciones aleatorias es +/- 25% (Poisson).

En el caso de que el procedimiento de ensayo no logre el agotamiento de la población en cuantificación y ésta supere el rango de conteo de colonias definido (normalmente hasta 200 ó 300 colonias, según el método del que se trate) no refleja el límite superior del método sino una dilución equivocada. Estas situaciones afectan la confiabilidad del resultado por la pérdida de proporcionalidad (pérdida de linealidad) que ocurre con la alta densidad de colonias por placa. El manejo de estos casos se detalla en cada procedimiento de ensayo. Para el método de filtración por membrana se establece el límite superior de no más de 200 UFC/100mL por filtro de membrana.

Otra consideración con el límite superior es la presencia de traslape o enmascaramiento de colonias debido a crecimiento de otros organismos no-objeto o interferentes. Esta condición se corrige al emplear métodos de ensayo que sean selectivos o específicos de los organismos objeto de cuantificación.

5.4.4 Rango

Indica el intervalo entre el límite de detección y límite superior. Sin embargo, el rango de trabajo (sin dilución) establecido para las pruebas microbiológicas de coliformes totales, termotolerantes y *E. coli* se ajustan a la cantidad óptima de colonias por membrana. De acuerdo a lo anterior, en el método de filtración por membrana para coliformes totales y *E. coli*, las colonias sobre el filtro deben estar entre 20-80 y de 20-60 para coliformes termotolerantes.

5.4.5 Sensibilidad

Capacidad del método para detectar al microorganismo de estudio. Determinado por el análisis de suficientes muestras utilizando al menos 2 adiciones de suspensiones del microorganismo objeto o aumentando o disminuyendo el volumen de la muestra o dilución analizada, seguido de un análisis estadístico confiable.

5.4.6 Precisión

Para la cuantificación de la precisión se emplearon los resultados del análisis de muestras naturales y muestras de organismos de referencia definidos para los límites de trabajo evaluando la repetibilidad y reproducibilidad de cada método de ensayo.

Se consideró como condición de Repetibilidad el diseño de desempeño de un analista en el análisis de muestras duplicadas en un número suficiente para el manejo estadístico y establecimiento de la desviación estándar relativa.

Para la cuantificación de la reproducibilidad se consideraron dos posibles condiciones; la obtenida entre dos analistas empleando el mismo método y la obtenida por un mismo analista empleando dos métodos o dos variantes del mismo método (método de referencia vs método validado). El cálculo de reproducibilidad equivale al efecto combinado de la incertidumbre de los analistas y del método.

La incertidumbre de la medición se describe en el instructivo general para el cálculo de incertidumbre y ésta se cuantifica para la validación de los métodos de ensayo de acuerdo a la fórmula:

$$U = k u_c(y) = 2 S_R$$

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS		
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022
	Página: 11 de 22		

Dónde:

U = Incertidumbre expandida

k = Factor de cobertura; para p=95%, k = 2

$u_c(y)$ = Incertidumbre estándar combinada

6. Contenido

6.1 Análisis fisicoquímicos

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte del laboratorio, se busca determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos.

En este sentido, es importante asignar un responsable de realizar dicha tarea, de manera que la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. También es importante que el laboratorio tenga claridad antes de iniciar la validación, de cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación.

Es esencial conocer el método a validar y su aplicabilidad, es decir, el analito, su concentración (MCD, MCC, LMP, etc.) y la matriz (o matrices) en las cuales se desea utilizar.

El laboratorio debe validar:

1. Métodos no normalizados: corresponden a métodos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos (por ejemplo, publicados en revista científica), o bien, a métodos que tradicionalmente se han utilizado en el laboratorio pero que no están normalizados.
2. Método normalizado con una modificación significativa.

Seguir el procedimiento de ensayo propuesto para el método a validar. Seleccionar la(s) muestra(s) de referencia o estándares a utilizar para la validación.

Cuando se trata de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que no esté normalizado, se puede realizar una validación retrospectiva, es decir, con base en los datos experimentales que el laboratorio dispone, para la cual se realizará la recopilación de la mayor cantidad de datos históricos disponibles, para luego realizar un proceso de ordenamiento y selección de los datos recopilados, estos datos pueden ser: curvas de calibración, resultados de ensayos, cartas de control, ensayos de aptitud, etc. A través de estos, se deberán determinar los parámetros de validación, y evaluar si los resultados obtenidos son aceptables para la validación del método.

En caso de ser un método nuevo (o uno antiguo del que no se disponga de datos suficientes), se debe realizar una validación prospectiva, generando a través de análisis datos experimentales.

En algunos casos se debe realizar una validación menor o verificación del método cuando se trate de:

1. Métodos normalizados.
2. Métodos normalizados usados fuera de su alcance propuesto. Ejemplo: uso en otra matriz.
3. Ampliaciones y modificaciones menores de métodos normalizados. Ejemplo: uso en otros analitos.
4. Métodos previamente validados, que hayan sufrido alguna alteración significativa por lo cual deben volverse a evaluarse.

La verificación de un método tiene como objetivo comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado, y lo utiliza correctamente, en caso de tratarse de un método normalizado modificado, para la verificación se requiere solo realizar aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta el ensayo.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 12 de 22

El objetivo de la validación y la verificación, es demostrar que el método utilizado por el laboratorio es adecuado para la aplicación en la que se propone utilizar, así como también demostrar que las modificaciones que pudieron haberse realizado no afectan su desempeño, ni la confiabilidad de los resultados emitidos.

Los parámetros de validación o verificación deberán determinarse de acuerdo al tipo de método, los cuales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1. Parámetros de validación y verificación de métodos

Parámetro a evaluar*	Características	Método		
		Normalizado	Modificado	Nuevo
Selectividad	Identificación analito Interferencia de matriz	No	Sí	Sí
Linealidad	Rango lineal	Sí	Sí	Sí
Sensibilidad	Pendiente	No	Sí	Sí
Límites	Límite de detección Límite de cuantificación	Sí	Sí	Sí
Exactitud	Error	Sí	Sí	Sí
Precisión	Repetibilidad Reproducibilidad	Sí	Sí	Sí
Veracidad	Recuperación	Sí	Sí	Sí
Robustez	Cartas de control	Sí	Sí	Sí
Aplicabilidad	Declaración de aplicabilidad del método	Sí	Sí	Sí

*Los parámetros a evaluar no aplican a todos los métodos del laboratorio

Desarrollo de pruebas de parámetros de validación

Para el desarrollo de las pruebas de validación, los analistas a cargo deberán conocer el procedimiento del método de ensayo, y el número de ensayos o mediciones a realizar, de acuerdo a lo establecido. El personal responsable de realizar los análisis debe estar debidamente capacitado, y los equipos asociados al método deben encontrarse calibrados y/o verificados antes de su uso. Los resultados obtenidos en cada prueba deben ser debidamente registrados en la bitácora respectiva.

Protocolo:

Antes de dar inicio a las mediciones, se debe garantizar que el método está montado y que los equipos que se emplearán funcionan correctamente. La parte experimental consiste en el procesamiento de las muestras de cada grupo diario de ensayos. Los ensayos se deben correr en días diferentes, pueden ser continuos o alternos, con una diferencia máxima de 3 días entre un ensayo y otro, teniendo en cuenta la estabilidad del analito, la disponibilidad de materiales o equipos, condiciones específicas del método, entre otros factores de interés.

El grupo básico de muestras a correr en cada ensayo es el siguiente:

- BK (Blanco de reactivos y procedimiento)
- Eb (Estándar de concentración baja, que nos permita calcular el LDM)
- Em (Estándar de concentración media; aproximadamente el 50% del rango)
- Ea (Estándar de concentración alta; aproximadamente el 90% del rango)
- M1 (Muestra natural para analizar el efecto de la matriz real, concentración <50% del rango)
- M2 (Muestra natural para analizar el efecto de la matriz real, concentración >>M1)
- M1Fb (M1 fortificada con un nivel bajo, máximo el 30% del valor de M1)
- M1Fa (M1 fortificada con un nivel alto, mínimo el 50% del valor de M1)
- Mc (Muestra o estándar certificado). Se puede utilizar en el último o los dos últimos ensayos.

Este grupo básico se puede correr por duplicado, con un total de 7 ensayos. Para la obtención de los datos primarios en esta etapa de los ensayos se requiere que en su ejecución se tengan en cuenta las siguientes condiciones:

- Cada grupo de muestras se analiza en el mismo día corriendo todas las muestras en forma paralela.
- Es recomendable que el proceso se inicie siempre a la misma hora y lo suficientemente temprano para que se pueda cumplir con el análisis de todas las muestras, teniendo en cuenta que pueden ocurrir imprevistos.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS		
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022
	Página: 13 de 22		

- Los datos se deben registrar en la respectiva bitácora en el mismo momento en que se obtienen (no transcribir, copiar, etc.). Las cifras erradas se deben corregir inmediatamente, dejando constancia por parte del analista en forma clara en qué consistió el error.
- Aplicar al conjunto de datos obtenidos el criterio estadístico para el rechazo de datos establecido en el instructivo general IN-GAA 90.

Los ensayos o mediciones realizadas serán con el fin de hacer las siguientes pruebas:

6.1.1 Selectividad e interferencia

- Analizar las muestras de referencia o el estándar.
- Analizar muestras reales (muestras que contengan impurezas).
- Comparar los resultados obtenidos con los valores de referencia.
- Registrar en el reporte de validación, en términos de las interferencias del método.
- En caso de presentarse diferencias en los resultados obtenidos, proponer un procedimiento analítico para eliminar dichas interferencias.

6.1.2 Linealidad

- Determinar la linealidad analizando una serie de soluciones de referencia de diferentes concentraciones a través de todos los pasos del método, independientemente una de otra, que cubran el rango esperado del método.
- Realizar tres (3) curvas de calibración con los estándares, incluido el blanco.
- Construir la curva de calibración (de regresión lineal o del tipo que aplique)
- Determinar el valor de coeficiente de correlación promedio de las 3 curvas.
- Documentar la ecuación de la curva obtenida y el rango expresado, en las mismas unidades de concentración que los resultados.

Criterios de aceptación: aceptar un coeficiente de correlación mayor a 0.995.

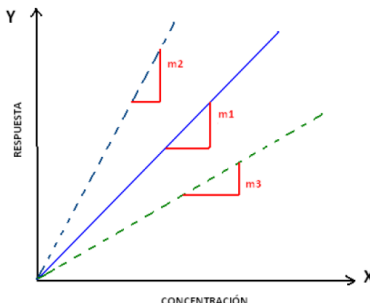
6.1.3 Sensibilidad

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición, y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración.

El valor de sensibilidad obtenido [m] debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración con base en la lectura.

En la figura 1 se observa que mientras más próxima al eje de las Y esté la recta, significa que a ligeros cambios en las concentraciones esperadas habrá grandes variaciones en los resultados de las lecturas observadas [m2]. En el caso de [m3] grandes cambios en la concentración no son significativos para la lectura.

Figura 1. Sensibilidad expresada como pendiente de la curva de calibración



Un método es sensible cuando una pequeña variación de concentración determina una gran variación de respuesta. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito. En el tiempo, se visualiza cómo se comporta el instrumento.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 14 de 22

6.1.4 Límites de detección del método analítico

6.1.4.1 Límite de detección instrumental

Un instrumento de análisis en funcionamiento, produce normalmente una señal (ruido) incluso cuando no existe ninguna muestra o se analiza un blanco.

El Límite de Detección del Instrumento (LDI) es la concentración del compuesto que produce una señal superior a tres desviaciones estándar (3s) del nivel de ruido medio, o que puede determinarse mediante la inyección de un estándar, para producir una señal que sea 5 veces la relación señal /ruido. El LDI resulta muy útil para valorar la concentración de los componentes, o la cantidad de un extracto necesario para producir una señal que permita calcular un límite de detección estimado.

6.1.4.2 Límite de detección del método (LDM)

El límite de detección (MCD: Mínima Concentración Detectable) de un método está definido como la mínima concentración de una sustancia que puede ser medida y reportada con un 99% de confianza, que la concentración del analito es mayor que el cero. Esta se determina en el análisis de una muestra en una matriz dada que contiene al analito.

Hacer un estimado del límite de detección, por una de las siguientes formas:

- La concentración equivalente a tres veces la desviación estándar de medidas instrumentales de réplicas del analito, de una concentración cercana al blanco de reactivo.
- Aquella región de la curva de calibración donde hay un cambio significativo en la sensibilidad, por ejemplo, un quiebre en la pendiente de la curva.
- Límites reportados en literatura o manuales del equipo.

Para calcular el límite de detección, realizar el siguiente procedimiento:

- Preparar agua reactiva (blanco) que esté libre del analito, tanto como sea posible. El agua reactivo o agua libre de interferencia está definida como una muestra de agua en la cual el analito y las concentraciones interferentes no son detectadas al límite de detección del método de cada analito de interés. Las interferencias son definidas como errores sistemáticos en la medida de una señal analítica de un procedimiento establecido, causada por la presencia de especies interferentes. La concentración interferente se presupone está normalmente distribuida en muestras representativas de una matriz dada.
- Preparar un estándar de laboratorio (analito en agua reactivo) a una concentración conocida cercana al blanco de reactivos.
- Medir mínimo siete (7) alícuotas del estándar de referencia de concentración cercana al blanco de reactivos, y cuantificar la concentración del analito, a través de todos los pasos propuestos del método de ensayo, independientemente una de otra.

Con los resultados obtenidos calcular:

- La media
- La desviación estándar
- La mínima concentración detectable, según la siguiente ecuación:

$$LDM = \bar{x} + t_{\text{student } (n-1)} * S$$

Dónde:

X= promedio de los datos

LDM = Límite de detección del método

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 15 de 22

$t_{\text{students (n-1)}}$ = Valor de t students para n-1 grados de libertad al 99 % de confianza (3.14 para 7 réplicas).
s = Desviación estándar de los datos

Nota 1: El valor de $t_{\text{students (n-1)}}$ depende del número de réplicas realizadas

Los resultados obtenidos se registran en el formato e informe de validación o verificación de métodos.

6.1.5 Límite de cuantificación del método

El límite de cuantificación del método (MCC: Mínima Concentración Cuantificable) es la concentración del componente que produce una señal suficientemente mayor que el blanco, que puede detectarse con una precisión y exactitud aceptable bajo las condiciones establecidas de la prueba. Es la concentración típica que produce una señal 10s (diez veces la desviación estándar) superior a la señal del blanco.

Para calcular la MCC proceder de la siguiente manera:

- Preparar un estándar de referencia (analito en agua reactivo) a una concentración conocida cercana al blanco de reactivos.
- Medir mínimo siete (7) alícuotas del estándar de referencia de concentración cercana al blanco de reactivos, y cuantificar la concentración del analito a través de todos los pasos propuestos del método de ensayo, independientemente una de otra.

Con los resultados obtenidos calcular:

- La media
- La desviación estándar
- El coeficiente de variación
- La mínima concentración cuantificable, según la siguiente ecuación:

$$\text{LCM} = x + 10 \cdot s$$

Dónde:

X= promedio de los datos

LCM= Límite de cuantificación del método

10= Recíproco de la desviación estándar relativa (RSD) de 10%

s= Desviación estándar de los datos

Los resultados obtenidos se registran en el formato e informe de validación o verificación de métodos.

6.1.6 Exactitud del método

- Analizar siete réplicas de una solución de referencia o de muestra fortificada, procesadas a través de todos los pasos del método, independientemente una de otra.
- Calcular el valor promedio de las mediciones.
- Calcular el porcentaje de error (%) de la muestra:

$$\%E = \frac{(C_t - C_e)}{C_t} * 100$$

Dónde:

%E: porcentaje de error

Ct: Concentración teórica del estándar de referencia o muestra fortificada

Ce: Concentración experimental del estándar de referencia o muestra fortificada.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS		
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022
	Página: 16 de 22		

Criterios de aceptación: establecer los criterios de aceptación de acuerdo a los resultados obtenidos en la validación o verificación del método. Se recomienda emplear criterios de aceptación de variación en la exactitud del método $\leq 10 \%$ para aguas y $\leq 20 \%$ para suelos, lodos y sedimentos.

6.1.7 Precisión

Se evalúa en términos de Repetibilidad, Reproducibilidad Interlaboratorio, Reproducibilidad Intralaboratorio (precisión intermedia).

Para el caso de la Repetibilidad seguir el siguiente protocolo:

- Analizar en un mismo día mínimo siete (7) réplicas de una solución de referencia, muestra o de muestra fortificada procesadas a través de todos los pasos del método, independientemente una de otra.
- Calcular la desviación estándar (s).
- Calcular la precisión en términos de Repetibilidad.
- Calcular la repetibilidad r (al 95% de confianza, en condiciones de repetibilidad) con la desviación estándar de siete o más datos, como coeficiente de variación así:

$$r = 100 * s_r / x_{pro}$$

Dónde:

r: Repetibilidad

s_r: Desviación estándar de la repetibilidad

x_{pro}: Promedio de las mediciones

Para determinar la precisión de la reproducibilidad intralaboratorio (Ri) se sigue el siguiente procedimiento:

- Realizar al menos siete (7) mediciones en días distintos, o en un mismo día cambiando a lo menos una condición analítica (ejemplo: operador, equipo, reactivos, y largo intervalo de tiempo) de un analito en un Material de Referencia, muestra o de muestra fortificada procesadas a través de todos los pasos del método, independientemente una de otra.
- Calcular la desviación estándar (s) y el porcentaje de coeficiente de variación
- Calcular la reproducibilidad intralaboratorio Ri (al 95% de confianza, en condiciones de reproducibilidad) con la desviación estándar de siete o más datos, como coeficiente de variación así:

$$Ri = 100 * S_R / X_{pro}$$

Dónde:

Ri: Reproducibilidad intralaboratorio

S_{Ri}: Desviación estándar de la reproducibilidad

x_{pro}: Promedio de las mediciones

Criterios de aceptación: establecer los criterios de aceptación de acuerdo a los resultados obtenidos en la validación o verificación del método. Se recomienda emplear criterios de aceptación de variación en la precisión del método $\leq 10 \%$ para aguas y $\leq 15 \%$ para suelos, lodos y sedimentos.

6.1.8 Veracidad

La veracidad del método se evalúa mediante el cálculo de la recuperación del analito.

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación esta intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra. Para estimar la veracidad del método, realizar el siguiente procedimiento:

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS		
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022 Página: 17 de 22

- Seleccionar una de las matrices de agua existente (potable, superficial, subterránea, agua residual doméstica y/o agua residual industrial).
- Analizar la concentración inicial del analito de interés en la matriz de agua seleccionada. Aplicar análisis estadístico al conjunto de datos (promedio, desviación estándar y rechazo de datos).
- Dopar o fortificar la matriz seleccionada con una concentración del analito de interés igual o mayor a la concentración inicial del analito en la muestra matriz.
- Aplicar el procedimiento analítico para cuantificar el analito de interés en la muestra dopada.
- Realizar siete réplicas del análisis. Aplicar análisis estadístico al conjunto de datos: rechazo de datos, promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y porcentaje de recuperación.
- Evaluar el promedio obtenido de las réplicas fortificadas conforme los criterios de aceptación establecidos en el Instructivo General IN-GAA-133 para el aseguramiento de la validez de los resultados.

Nota: Si en la muestra matriz la concentración del analito de interés es inferior a la MCC del método, la recuperación se evalúa teniendo en cuenta el criterio descrito en el numeral 5.1 para el análisis estadístico del conjunto de datos.

Con los resultados obtenidos calcular la recuperación del analito, según la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{(CF - CFS)}{CA} * 100$$

Dónde:

%R: Porcentaje de recuperación

CF: concentración del analito en la muestra fortificada

CFS: concentración del analito medida en la muestra sin fortificar

CA: concentración del analito adicionado a la muestra fortificada

Criterios de aceptación: establecer los criterios de aceptación de acuerdo a los resultados obtenidos en la validación o verificación del método. Se recomienda emplear criterio de aceptación para porcentaje de recuperación entre 80-120% para aguas, y entre 70-130% para suelos, lodos y sedimentos.

6.1.9 Robustez

Un método de ensayo es más robusto entre menos se vean afectados sus resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas.

Entre las condiciones analíticas que pueden afectar a un método se encuentran:

- Analistas
- Equipos
- Reactivos
- pH
- Temperatura
- Tiempo de reacción
- Estabilidad de la muestra
- Otros

Para evaluar este parámetro se crean cartas de control en las cuales se grafica la variación de la concentración del analito de interés, respecto a algunas de las condiciones analíticas antes mencionadas, por ejemplo, el analista o equipo.

Criterios de aceptación: evaluar la precisión y exactitud de los resultados según los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio.

6.1.10 Aplicabilidad

Se utiliza el término de aplicabilidad cuando un método de análisis puede utilizarse satisfactoriamente para los analitos, matrices y concentraciones previstas. La declaración de aplicabilidad (o ámbito de aplicación), además

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA		
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS		
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022
			Página: 18 de 22

de una declaración del margen de funcionamiento satisfactorio para cada factor, debe incluir también advertencias acerca de la interferencia conocida de otros analitos, o de la inaplicabilidad a determinadas matrices y situaciones.

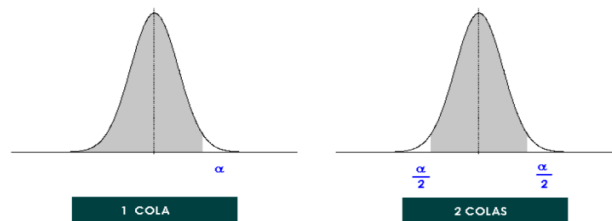
6.1.11 Pruebas de significancia

Es frecuente utilizar pruebas de significancia estadísticas durante el proceso de validación de los métodos analíticos, en este sentido se aplica comúnmente la Prueba F-Fisher para identificar errores aleatorios (precisiones).

Al hacer una prueba de significancia se comprueba la veracidad de una hipótesis experimental llamada “**hipótesis alternativa**” (H1, si hay diferencia,) con respecto a la **hipótesis nula** (H0, no hay diferencia).

Es la hipótesis alternativa la que determina el número de colas. Si la **hipótesis alternativa** contiene la frase “**mayor que**” o “**menor que**”, la prueba es de una-cola. Si la hipótesis alternativa contiene la frase “**no es igual que**”, la prueba es de dos-colas.

Figura 2. Distribución normal de una y dos colas



6.1.12 Comparación de desviaciones estándar mediante la prueba F de Fisher

En muchos casos es necesario comparar las desviaciones estándar, es decir los errores aleatorios de dos conjuntos de datos. Se pretende probar si el método A es más preciso que el método B (es decir, un contraste de una cola) o si los métodos A y B difieren en precisión (es decir un contraste de dos colas).

El contraste F considera la razón de las dos varianzas muestrales, es decir las razones de los cuadrados de las desviaciones estándar s_1^2/s_2^2 .

Para probar si es significativa la diferencia entre dos varianzas muestrales, esto es para probar la hipótesis nula $H_0: s_1^2 = s_2^2$, se calcula el estadístico F:

$$F = s_1^2/s_2^2$$

Donde 1 y 2 se disponen en la ecuación de manera que **F sea siempre ≥ 1** .

- ✓ El número de grados de libertad del numerador y del denominador son n_1-1 y n_2-1 respectivamente.
- ✓ Si la hipótesis nula es verdadera, entonces la relación de varianzas debería ser próxima a 1.
- ✓ La diferencia respecto de 1 se debe a variaciones aleatorias, pero si la diferencia es demasiado grande no se podría atribuir a esta causa.
- ✓ Este valor crítico de F depende del tamaño de las dos muestras, del nivel de significación y del tipo de contraste realizado.

Contraste de dos colas

Si el valor calculado de F es inferior al valor crítico obtenido de la tabla 2, se acepta la hipótesis nula y no hay diferencia significativa entre las dos varianzas a un nivel del 5%.

Tabla 2. Valores críticos de F para un contraste de dos colas (P=0.05), Miller y Miller (2000)

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 19 de 22

v_2	v_1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20							
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.7	963.3	968.6	976.7	984.9	993.1							
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43	39.45							
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25	14.17							
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.751	8.657	8.560							
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.525	6.428	6.329							
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.366	5.269	5.168							
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.666	4.568	4.467							
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.200	4.101	3.999							
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.868	3.769	3.667							
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.621	3.522	3.419							
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.430	3.330	3.226							
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.277	3.177	3.073							
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.153	3.053	2.948							
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.050	2.949	2.844							
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	2.963	2.862	2.756							
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.889	2.788	2.681							
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.825	2.723	2.616							
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.769	2.667	2.559							
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.720	2.617	2.509							
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.676	2.573	2.464							

V_1 : número de grados de libertad del numerador

V_2 : número de grados de libertad del denominador

Contraste de una cola

Si el valor calculado de F supera cierto valor crítico obtenido de la tabla 3, se rechaza la hipótesis nula, y la varianza del método patrón es significativamente mayor que la del método propuesto a un nivel de probabilidad del 5%, es decir, el método propuesto es más preciso.

Tabla 3. Valores críticos de F para un contraste de una cola ($P=0.05$), Miller y Miller (2000).

v_2	v_1																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20							
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0							
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45							
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660							
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803							
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558							
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874							
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445							
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150							
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936							
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774							
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646							
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544							
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459							
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388							
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328							
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276							
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230							
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191							
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155							
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124							

V_1 : número de grados de libertad del numerador

V_2 : número de grados de libertad del denominador

6.1.13 Informe de validación o verificación del método

El laboratorio debe realizar un informe de validación o verificación del método, en el cual se presentan los resultados obtenidos, el análisis estadístico de los mismos y las conclusiones. La declaración de la aplicabilidad del método se registra en el objetivo de cada instructivo de ensayo.

Las confirmaciones de la mínima concentración cuantificable (MCC) y la mínima concentración detectable (MCD) se registrarán en el formato validación de métodos disponible en el laboratorio.

Al imprimir este documento se convierte en copia no controlada del SIG y su uso es responsabilidad directa del usuario

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 20 de 22

6.2 Análisis hidrobiológicos

En el caso de los grupos hidrobiológicos, solo se puede obtener el parámetro de la precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad). Los procedimientos se realizan independientemente por cada grupo hidrobiológico.

A. Repetibilidad.

Este análisis consiste en revisar la misma muestra al menos dos veces por el mismo analista con la mínima variación de las condiciones y del ambiente.

- El coordinador del laboratorio escoge una muestra para la validación y se la entrega al analista.
- Se realiza el procedimiento de cuantificación e identificación como está descrito en los instructivos de muestreo y análisis (según el grupo evaluado).
- Se repite el procedimiento inmediatamente, contando de nuevo toda la muestra (p.ej. peces) o una nueva alícuota (p.ej. perifiton).
- El analista entrega la muestra al coordinador con su respectiva matriz de identificación y cuantificación (hoja de cálculo).
- El coordinador calcula la similitud con el coeficiente de Bray-Curtis siguiendo la fórmula descrita en “Consideraciones generales” entre las dos revisiones realizadas a la misma muestra.
- Si el analista realizó más de dos revisiones, se debe calcular la similitud por pares de revisiones y luego se calcula un promedio con su respectivo coeficiente de variación.
- Se contrasta el valor de similitud contra las escalas descritas en “Consideraciones generales” y se decide si la validación es positiva.
- El coordinador analiza y determina la validez de los métodos y los reporta en el informe de validación de cada prueba.

B. Precisión intermedia.

Este análisis consiste en que cada analista revise la misma muestra al menos una vez. Si solo se cuenta con un analista por grupo hidrobiológico, este debe realizar al menos dos revisiones de la misma muestra, pero cambiando condiciones del procedimiento, por ejemplo, el tiempo entre revisiones debe ser mínimo de dos días de diferencia, cambiar de equipo de laboratorio, realizar las revisiones en diferentes momentos del día, realizar revisiones de otras muestras entre las revisiones de la validación, entre otras.

El procedimiento es el mismo descrito para repetibilidad. Las variaciones deben quedar anotadas en el formato de validación y descritas en el informe.

C. Reproducibilidad.

Este análisis es consiste en realizar lo mismo que la precisión intermedia, pero en este caso, se debe buscar al menos un laboratorio o profesional externo para que realice el análisis de la muestra según el procedimiento del Centro de Calidad de Aguas del ICAOC. El analista externo debe entregar al líder del Centro de Calidad de Aguas los resultados obtenidos para poder realizar los respectivos cálculos.

6.3 Análisis ecotoxicológicos

Para la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad, se realiza el mismo procedimiento de laboratorio descrito en el INSTRUCTIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA DE SUSTANCIAS SOBRE SISTEMAS BIÓTICOS. La sustancia con la cual se evaluará la toxicidad aguda es el Dicromato de Sodio.

- El coordinador determina las fechas de validación para cada una de las pruebas.
- Cada analista realiza el procedimiento para cada una de las pruebas siguiendo lo descrito en el instructivo.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 21 de 22

- Cada analista entrega los resultados obtenidos al coordinador. Los resultados constan de los valores obtenidos en bruto y la concentración letal al 50% obtenido a partir de los datos en bruto.
- El coordinador determina la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (según sea el caso), siguiendo los criterios y métodos descritos en "Condiciones generales".
- El coordinador analiza y determina la validez del método, dejando constancia en el informe de validación para el método.

6.4 Análisis microbiológicos

El siguiente procedimiento se realiza por cada matriz de forma similar.

A. Estandarización de las cepas de trabajo.

- Se estandariza la concentración promedio de unidades formadoras de colonias (UFC) en las diluciones de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} de la cepa *Escherichia coli*, *Klebsiella aurogenes* y *Staphylococcus aureus*.
- La estandarización se realiza preparando un inóculo de la cepa en caldo nutritivo incubado durante 24 +/- horas y realizando diluciones seriadas hasta 10^{-10}

B. Fortificación de la muestra.

- Cada matriz es procesada por duplicado al igual que las fortificadas. La siembra de la réplica 1 y réplica 2 se dopan o se fortifican las matrices utilizando las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} esto se realiza siete veces (por cada cepa estandarizada) y realizando los respectivos cálculos con la cepa.
- Se realiza el procedimiento descrito en el IN-GAA-97 INSTRUCTIVO DE RECuento ESCHERICHIA COLI Y BACTERIAS COLIFORMES FILTRACION POR MEMBRANA y en el IN-GAA-205 INSTRUCTIVO DE RECuento DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES POR EL MÉTODO DE FILTRACION POR MEMBRANA.

C. Análisis de validación de los métodos.

- La información obtenida es tabulada en una matriz tipo hoja de cálculo por el analista y es entregado al coordinador o encargado del laboratorio.
- El coordinador escoge para cada matriz de agua analizada, las réplicas (según dilución de las cepas usadas para fortificar) que mejor cuantificaron los grupos de bacterias.
- El coordinador realiza los cálculos de los métodos de recuperación, repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (según sea el caso) con las réplicas escogidas. Los procedimientos para cada una de las valoraciones se encuentran descritas en las "Consideraciones generales".
- El coordinador analiza y determina la validez del método, dejando constancia en el informe de validación para el método.

7. Flujograma.

No Aplica

8. Documentos de Referencia:

- Formato de validación o verificación de métodos
- Bitácora de validación o verificación de métodos
- informe de validación o verificación de métodos

9. Listado de anexos

No aplica

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO GENERAL PARA LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE MÉTODOS			
	Código: IN-GAA-132	Versión: 05	Fecha de aprobación: 10/10/2022	Página: 22 de 22

10. Historial de Cambios:

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	22/02/2019	Documento nuevo	Marlene Estrada <i>Prof. Químico</i>		Marco A. Torres <i>Director ICAOC</i>
02	13/03/2019	Correcciones estructurales y de redacción.	Mario Gutiérrez <i>Prof. de Calidad</i>	Marlene Estrada <i>Líder Técnico</i>	Mario Gutiérrez <i>Prof. de Calidad</i>
03	14/06/2019	Inclusión de los criterios para el cálculo del porcentaje de recuperación en muestras fortificadas en la sección 5.1 y evaluación estadística de los resultados en la sección 6.1.8, inclusión de referencias bibliográficas	Marlene Estrada <i>Líder Técnico</i>	Marlene Estrada <i>Líder Técnico</i>	Juan M. Trujillo <i>Director CCA</i>
04	03/08/2022	Inclusión de la exactitud, sensibilidad, rango y límite de detección para muestras microbiológicas. Actualización de las cepas de referencia utilizadas para la verificación del método de filtración por membrana y actualización en la numeración de los instructivos. Se cambia la ecuación para el cálculo de LCM y LCD.	Yair Zapata <i>Biólogo</i>	Karen Mendoza <i>Profesional Calidad</i>	Juan M. Trujillo <i>Director CCA</i>
05	10/10/2022	Inclusión de la exactitud, sensibilidad, rango y límite de detección para muestras microbiológicas. Actualización de las cepas de referencia utilizadas para la verificación del método de filtración por membrana y actualización en la numeración de los instructivos. Se cambia la ecuación para el cálculo de LCM y LCD.	Yair Zapata <i>Biólogo</i>	Karen Mendoza <i>Profesional Calidad</i>	Juan M. Trujillo <i>Director CCA</i>