



| | | |
|---|----------------------|---------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 1 de 23 | |

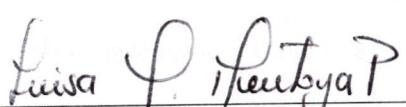
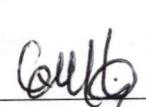
1. OBJETIVO

Establecer los lineamientos y procedimientos que deben seguirse en los laboratorios de aguas de la empresa Serviciudad ESP durante la validación/confirmación de los métodos de ensayo. Esto incluye métodos no normalizados, desarrollados o diseñados por el laboratorio, así como métodos normalizados utilizados fuera del alcance previsto, y ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados. Se describirán los atributos estadísticos para cada metodología con el fin de demostrar la competencia para la obtención de resultados confiables y confirmar que los métodos normalizados se pueden operar adecuadamente antes de introducir los ensayos. Este instructivo busca proporcionar un marco sistemático y documentado que garantice la fiabilidad, precisión y exactitud de los resultados obtenidos, asegurando la calidad de los servicios analíticos prestados y demostrando la competencia técnica del laboratorio.

2. ALCANCE Y RESPONSABLES

Este instructivo aplica para la confirmación y/o validación de todas las técnicas analíticas llevadas a cabo en los laboratorios de la empresa Serviciudad E.S.P.

La administración y control de este documento es responsabilidad del Técnico de Calidad de Agua. Los ajustes o cambios en el documento serán llevados a cabo por el Técnico de Calidad, Técnico de Microbiología y/o los laboratoristas químicos de agua. La ejecución del desarrollo del instructivo estará a cargo del personal de los laboratorios de aguas de la empresa Serviciudad E.S.P.

| ELABORADO POR: | REVISADO POR: | APROBADO POR: |
|--|---|---|
|  Luisa Marina Montoya Posada Técnico de Calidad Fecha: 2024-01-24 |  Genny Marcela Hurtado Giraldo Profesional Planta de Tratamiento Fecha: 2024-01-26 |  Eduardo Andrés Brand Ruiz Subgerente Técnico y Operativo Fecha: 2024-01-30 |



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 2 de 23 | |

3. TERMINOS Y DEFINICIONES

Método normalizado: métodos publicados por otros organismos, generalmente comunidades científicas, ejemplo, EPA, ASTM, ISO, etc.

Validación: de acuerdo a la ISO/IEC 17025 es la confirmación a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Confirmación: la aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados.

Blanco de Reactivos o Blanco de Método (MB): agua ultra pura que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos solventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra.

Blanco Fortificado de Laboratorio (BFL): es una muestra de agua de reactivo a la que se ha añadido una concentración conocida del analito de interés. Se utiliza para evaluar el desempeño de laboratorio, y la recuperación del analito en una matriz en blanco.

Muestra (M): el término se refiere a cada sistema físico que sea sometido al procedimiento de análisis siguiendo el método que se está confirmando o validando, ya sea un blanco, un estándar, una muestra adicionada, o una muestra real propiamente dicha.

Matriz Fortificada de Laboratorio (MFL): es una muestra natural o real a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito de interés. Esta adición debe realizarse antes de la preparación de la muestra.

Niveles de Detección: son aquellos que permiten determinar la concentración del analito, presente en la muestra. Actualmente, existen varios tipos de niveles de detección: Límite de detección instrumental (**LDI**), Límite de detección del método (**LDM**) y nivel de cuantificación (**LCM**), cada uno con un propósito. La relación entre ellos es aproximadamente LDI: LLD: LDM: LCM = 1: 2: 4: 10. Ocasionalmente, los analistas usan el LDI como guía para determinar el LDM.

Límite de Detección Instrumental (LDI): concentración de analito que produce una señal superior a la relación señal/ruido del instrumento.

Límite de Detección del Método (LDM): concentración de analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco.



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 3 de 23 | |

Límite de Cuantificación (LCM): Es la concentración de analito que produce una señal suficientemente más fuerte que el blanco, de modo que se puede detectar con un nivel específico de confiabilidad durante las operaciones de rutina

Linealidad: es la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento y se debe verificar si en el laboratorio se cumple el intervalo y tipo de linealidad que reporta la literatura del método.

Nota: Cuando la señal no es directamente proporcional a la concentración, por ejemplo, al trabajar con pH u otros electrodos de ion selectivo, se requiere una transformación de los valores medidos antes de que se pueda evaluar la linealidad.

Intervalo de Linealidad: hace referencia a la menor y la mayor concentración de analito en la muestra para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene el nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

Intervalo de Trabajo: intervalo de concentraciones donde actúa el método en cuestión. Debe estar incluido en el rango lineal.

Sensibilidad: es la variación de la respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente en una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente (m) de la recta de calibración. Como valor se puede reportar el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de confirmación o validación, indicando su desviación estándar. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta instrumental frente a una determinada cantidad de analito.

Precisión: es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, como la desviación estándar (s), y la desviación estándar relativa o Coeficiente de variación (CV).

Repetibilidad: Atributo de precisión. Es la variación más pequeña de los resultados, es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo, trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos).

Reproducibilidad: Atributo de exactitud, es una medida de la variabilidad, la cual supone dar la mayor variación en los resultados, entre laboratorios. La reproducibilidad se refiere a la variación



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 4 de 23 | |

entre laboratorios utilizando el mismo método, también puede referirse a la variación observada entre laboratorios utilizando diferentes métodos, pero con la intención de medir la misma magnitud.

Precisión Intermedia: es una estimación de la variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad. Las condiciones exactas utilizadas deben establecerse en cada caso. El objetivo es obtener una estimación de la precisión que refleje todas las fuentes de variación que se producirán en un solo laboratorio en condiciones de rutina: diferentes analistas, periodos de tiempo prolongado, diferentes piezas de equipos entre otros.

Exactitud: estimación de qué tan cerca está un valor medido del verdadero valor. La exactitud se estudia como dos componentes: 'veracidad' (sesgo) y 'precisión'.

Recuperación: es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como porcentaje.

Robustez: es una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método.

Selectividad Analítica: es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar.

Errores Sistemáticos: son errores relacionados con la forma en la que se utiliza el instrumento de medida. Se caracterizan por una desviación sistemática en relación con el valor verdadero; es decir, todas las medidas individuales son demasiado grandes o demasiado pequeñas. Un error sistemático positivo produce un valor central mayor que el valor verdadero y un error sistemático negativo da lugar a un valor central menor que el valor verdadero. Tanto los errores sistemáticos positivos como los negativos pueden afectar el resultado del análisis, con un efecto acumulativo que conduce a un error sistemático positivo o negativo neto.

Incertidumbre: parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mesurando, a partir de la información que se utiliza.



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 5 de 23 | |

Material Referencia Certificado (MRC): es aquel que cuenta con un valor de medida certificado y con un documento que demuestra su trazabilidad metrológica y en el que se declara su incertidumbre.

Material de Referencia (MR): cualquier material empleado como valor de referencia, ya sean reactivos de laboratorio de pureza conocida, productos químicos industriales u otros dispositivos. La propiedad o analito debe ser estable y homogénea pero no necesita contar con el alto grado de caracterización, trazabilidad metrológica, incertidumbre y documentación exigida a los MRC.

Cepa de Referencia: un cultivo de microorganismos procedente de una colección reconocida nacional o internacional.

Señal: relación de ruido.

4. GENERALIDADES

Este instructivo detalla las actividades y características generales que deben considerarse durante la confirmación/validación de un método de ensayo, ya sea normalizado, modificado o desarrollado por el laboratorio. Se aplica al proceso de confirmación/validación de métodos analíticos utilizados en los laboratorios de fisicoquímica y microbiología de aguas.

Es responsabilidad de los laboratorios verificar la correcta ejecución de los métodos antes de su implementación, asegurando que puedan alcanzar el desempeño requerido. La validación de un método proporciona información sobre sus capacidades y limitaciones, las cuales pueden surgir durante su uso rutinario bajo condiciones controladas.

Los criterios para determinar si los métodos se encuentran bajo control están establecidos en el instructivo de aseguramiento de calidad y en los instructivos de ensayo específicos para cada método.

Existen diferentes criterios utilizados para la realización de una confirmación/validación dentro de los laboratorios de la empresa Serviciudad, los parámetros deben ser evaluados según el alcance del proceso (Tabla 1) y de esta manera desarrollar la metodología que aplique.



| | | |
|---|----------------------|---------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 6 de 23 | |

Tabla 1. Criterios para realizar una Confirmación/Validación

| Métodos Normalizados | Método Normalizado Modificado | Métodos Desarrollado por el laboratorio |
|---|---|---|
| Confirmación <ul style="list-style-type: none"> - Límites (LDi – LD – LC) (detección instrumental, detección, cuantificación) - Intervalo de trabajo (Linealidad) - Sensibilidad (pendiente) - Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) - Exactitud o veracidad (sesgo, recuperación) - Incertidumbre - Estabilidad | Requiere validación parcial, se debe determinar (cuando aplique): <ul style="list-style-type: none"> - Límites (LDi – LD – LC) (detección instrumental, detección, cuantificación) - Intervalo de trabajo (Linealidad) - Sensibilidad (pendiente) - Selectividad - Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) - Exactitud o veracidad (sesgo, recuperación) - Robustez - Incertidumbre - Estabilidad | Requiere validación completa y se debe determinar (cuando aplique): <ul style="list-style-type: none"> - Límites (LDi – LD – LC) (detección instrumental, detección, cuantificación) - Intervalo de trabajo (Linealidad) - Sensibilidad (pendiente) - Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) - Exactitud o veracidad (sesgo, recuperación) - Robustez - Incertidumbre - Estabilidad |

Los protocolos y el alcance de la confirmación/validación pueden variar según el método analítico y su aplicación específica. Por lo tanto, es necesario establecer límites para cada una de las determinaciones analíticas. Los procedimientos de análisis deben ser confirmados/validados por personal competente para garantizar su fiabilidad y precisión.

La confirmación/validación del método debe ser tan exhaustiva como sea necesario para satisfacer las necesidades de su aplicación. Es importante tener en cuenta que los datos microbiológicos suelen seguir una distribución de Poisson. Por lo tanto, se debe evaluar si se ajustan a una distribución normal y, en caso contrario, se deben utilizar métodos estadísticos no paramétricos.

Para llevar a cabo los procedimientos detallados de confirmación/validación, se pueden utilizar como referencia documentos disponibles en internet provenientes de instituciones reconocidas como Eurachem, ISO, CENAM, IUPAC, entre otros. Estos organismos suelen proporcionar pautas y



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 7 de 23 | |

directrices rigurosas para la validación y confirmación de métodos analíticos.

Los laboratorios de Serviciudad deben garantizar que las modificaciones realizadas durante la confirmación/validación sean trazables y que se pueda establecer la nueva vigencia a través de una nueva versión del proceso de confirmación/validación. En el caso de desarrollo de métodos internos, estos deben ser evaluados periódicamente para asegurar que se ajusten al alcance y requisitos previamente establecidos para su uso.

Si un método normalizado es modificado por el organismo que lo publicó, se debe llevar a cabo una nueva confirmación en la extensión necesaria para validar los cambios realizados. Es esencial mantener un proceso de control de calidad continuo y riguroso para asegurar la fiabilidad y precisión de los métodos analíticos utilizados en los laboratorios de Serviciudad.

Cuando se realizan cambios a un método previamente validado, es fundamental determinar la influencia de estos cambios. Si se encuentra que estos cambios afectan la validación inicial del método, se debe llevar a cabo una nueva.

En el caso de cambios en las instalaciones o equipos de medición, también se requiere confirmar o validar nuevamente según sea necesario.

Además, es recomendable realizar una revalidación o reconfirmación del método cada 4 años, o según las necesidades y requisitos específicos del laboratorio. Este proceso garantiza que los métodos analíticos utilizados continúen cumpliendo con los estándares de calidad y las especificaciones requeridas a lo largo del tiempo.

Antes de llevar a cabo cualquier proceso descrito en el presente instructivo, todos los analistas que intervengan deberán tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Revisar que el material se encuentre perfectamente limpio y seco
- Cumplir con las precauciones y medidas de seguridad descritas en la versión vigente del Manual de Higiene y Seguridad Laboral STMH-01.
- Realizar el proceso bajo condiciones de aireación, iluminación, temperatura, humedad relativa y servicios de agua potable y desionizada adecuados para la correcta ejecución del ensayo.



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 8 de 23 | |

- Asegurar que los equipos a utilizar se encuentren en condiciones normales de operación. Realizar la verificación previa al uso de los equipos que lo requieran y asegúrese de que estén en cumplimiento antes de proceder con su utilización.
- Si se requiere pesaje de material de referencia o preparación de reactivos, se deberá realizar en la zona de balanzas.

5. DESARROLLO

5.1. PLANEACIÓN

En esta etapa se establecen las condiciones y el alcance de la Confirmación o Validación, para cada método objeto de evaluación. Estas condiciones se plasman en el formato STLABFO-10 Informe de Confirmación y/o Validación de Métodos.

Se deberá reunir una serie de pasos que permiten obtener información relevante y orientar el proceso. Para ello se requiere:

- Seleccionar el método para cada analito y por cada matriz. Debe contener los criterios de selección correspondientes para cada caso (Tabla 1) y diligenciar en la casilla correspondiente del formato STLABFO-10 Informe de Confirmación y/o Validación de Métodos.
- Disponer de una copia del procedimiento del método y tener claro el fundamento físico-químico y microbiológico del método y de la técnica a la cual pertenece la metodología del ensayo.
- Inventario de los reactivos que se necesitan para toda la confirmación o validación.
- Inventario de vidriería y otros materiales necesarios, señalando las cantidades necesarias para cada día y requerimientos para su limpieza.
- Verifique si los formatos de captura de datos existentes se adaptan a los requerimientos específicos de la metodología, de lo contrario diseñe y presente un formato para su aprobación, al técnico de calidad.
- Estime el intervalo de aplicación del método, teniendo en cuenta las necesidades del laboratorio, Información de la literatura (protocolo), Interés específico (ambiental), capacidad del equipo en el



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 9 de 23 | |

Laboratorio.

- Diseñar el plan de confirmación o validación en el formato STLABFO-10 Informe de Confirmación y/o Validación de Métodos, el cual debe incluir la preparación de reactivos, estándares, muestras y matriz fortificada de acuerdo con el tiempo de vida útil de cada uno y la estabilidad del analito. Este plan deberá ser presentado para revisión previa al técnico de calidad.

5.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

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

5.2.1. Métodos físico-químicos

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

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

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

Límite de detección del método (LDM): Para la determinación del límite de detección del método se puede partir del siguiente cálculo:

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

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

S_{blancos}: desviación estándar de los blancos.



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 10 de 23 | |

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

Para obtener el valor final del **LDM**, calcular la desviación estándar (s) de los siete datos y multiplicar por el valor t-student, para los respectivos grados de libertad, en el caso de que se realicen 7 medidas, t es igual 3.14. Para 6 grados de libertad en el nivel de confianza del 99%. El LDM se calcula por medio de la siguiente fórmula:

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

Donde:

s: Desviación estándar de los datos

X Promedio: Promedio de los datos

t: 3,14

Verificar si los datos tienen distribución normal (utilizar prueba de Anderson – Darling) y si hay existencia de datos anómalos (utilizar test de Grubbs), el criterio de aceptación es el mismo enunciado para los métodos fisicoquímicos.

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

Límite de cuantificación (LCM): Preparar mínimo 7 soluciones de concentración conocida (aproximadamente de 2.5 veces el límite de detección del método). En la validación tener en cuenta por lo menos 10 réplicas.

Verificar si los datos tienen distribución normal y si hay existencia de datos anómalos, si hay que



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 11 de 23 | |

eliminar máximo un dato. Los resultados de los ensayos deben cumplir con los criterios de porcentaje de coeficiente de variación y porcentaje de error del 10%. Si este criterio **NO** se cumple, preparar un patrón de concentración un poco más alta y realizar nuevamente los ensayos y así sucesivamente hasta lograr los niveles aceptados de precisión y exactitud. Cuando se cuenta con datos históricos se debe proceder con la verificación del límite de cuantificación establecido estadísticamente.

Linealidad: Establecer el intervalo lineal preparando una curva de calibración siguiendo lo establecido por el método de referencia o lo recomendado por proveedor, con los datos obtenidos calcular el coeficiente de correlación. La curva de calibración final debe tener por lo menos 5 puntos de calibración sin considerar el blanco, el coeficiente de regresión debe cumplir con lo especificado en la norma de referencia, en los casos no especificados este debe ser ≥ 0.995 en regresiones lineales. Preparar dicha curva de calibración durante tres días, una cada día.

Evaluar la exactitud de la curva de calibración de la siguiente manera: preparar y analizar un estándar de la misma concentración del primer nivel (límite de cuantificación), al recalcular su concentración con la curva de calibración el error relativo permitido no debe superar el $\pm 50\%$. Preparar y analizar un estándar cuya concentración sea hasta 5 veces la del primer nivel, al recalcular su concentración con la curva de calibración el error relativo permitido no debe superar el $\pm 20\%$. Preparar y analizar un estándar cuya concentración sea mayor a 5 veces la concentración del primer nivel, al recalcular su concentración el error relativo no debe superar $\pm 10\%$.

Lo anterior no aplica para métodos volumétricos y gravimétricos.

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



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 12 de 23 | |

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

El intervalo de trabajo debe ser verificado para cada una de las matrices analizadas. El límite inferior del rango corresponde al límite de cuantificación (LCM) y el límite superior se debe verificar analizando 7 réplicas de una muestra o un estándar que corresponda al 100% del rango, los criterios de aceptación son los mismos utilizados para el LCM.

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

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

El grupo básico de "muestras" a analizar está constituido por:

BK: Blanco del método.

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

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

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

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

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

M1F.b: M1 fortificada con un nivel bajo, máximo el 30% del valor de M1.

M1F.a: M1 fortificada con un nivel alto, mínimo el 50% del valor de M1.

MR: Material de referencia.

Del grupo básico de muestras se deben analizar en total 10 conjuntos de muestras en días diferentes, en un periodo mínimo de 5 y máximo de 10 días. Se debe tener en cuenta la estabilidad



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 13 de 23 | |

de analito a evaluar, por ejemplo, para métodos de análisis inmediatos con estabilidad no superior a 48 h (véase tabla SM: 1060: I del Standard Methods for Examination of Water and Wastewater), analizar los 10 conjuntos en 2 días. El estándar certificado no necesariamente se debe analizar con el grupo de muestras, si no hay cantidad suficiente realizar un triplicado.

Con los resultados de cada grupo de muestras se debe evaluar la distribución normal de los datos y la existencia de datos atípicos, se utilizará la prueba de Anderson y Darling, donde el estadístico p (p-valor) obtenido debe ser mayor a 0,05. Los datos atípicos serán estimados con el test de Grubbs, máximo se podrá descartar un dato.

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

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

Precisión:

Repetibilidad: Se evaluará con el grupo básico de muestras, el coeficiente de variación debe ser $\leq 10\%$, o lo estipulado por la norma de referencia.

Precisión intermedia: Se considera la precisión intermedia de los resultados obtenidos por dos analistas. En primer lugar, se debe verificar la exactitud de los analistas realizando el análisis de un duplicado de un estándar de referencia. Si la cuantificación del analito se determina por curva de calibración el analista 2 debe, preparar una curva de calibración y analizar 10 veces la muestra M1 del grupo básico de muestras. El análisis que debe realizar el analista 2 debe ejecutarse en diferente día al del analista 1. Evaluar si los datos obtenidos tienen distribución normal y si hay existencia de datos atípicos, luego evaluar si los dos analistas presentan diferencias significativas a través de un análisis de varianza de un factor (ANOVA). El criterio para determinar que el analista 1 y el analista 2 no poseen diferencias significativas es que el valor de F obtenido sea menor al valor crítico.

Nota: La muestra analizada debe ser la misma utilizada por el analista 1 y su concentración mayor o



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 14 de 23 | |

igual al límite de cuantificación establecido.

Exactitud:

Error relativo: Se evaluará con los estándares que se encuentran en el grupo básico de muestras, el criterio de aceptación es el error relativo $\leq 10\%$ o lo estipulado por la norma de referencia.

Porcentaje de recuperación: Se calculará para la matriz fortificada en cada nivel de concentración adicionado. El criterio de aceptación es lo estipulado por la norma de referencia.

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

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

Para su determinación, realizar un ensayo por triplicado para calcular el porcentaje de recuperación con un blanco de matriz fortificado y comparar el resultado con el obtenido del análisis por triplicado de un blanco de matriz fortificado que tenga posibles interferencias.

Robustez: Para evaluar la robustez se sigue el procedimiento propuesto en la tabla de Youden y Steiner, donde se realizan ocho (8) ensayos a siete (7) factores o variables. Los ocho (8) ensayos se analizan básicamente según el procedimiento de operación del método. Las letras A, B, C..., G indican el valor de la variable sin modificación y las letras a, b, c..., g indican la variable modificada, presencia o ausencia de un factor, u otras condiciones a investigar. Los resultados encontrados se representan mediante las letras s a la z. A continuación, se presenta la Tabla 2 para el estudio de robustez.



| | | |
|---|----------------------|---------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 15 de 23 | |

Tabla 2. Estudio de Robustez (Diseño para 4 factores)

| Ensayo | Experimento | | | | | | | |
|------------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A, a | A | A | A | A | a | a | a | A |
| B, b | B | B | B | B | b | b | b | B |
| C, c | C | C | C | C | c | c | c | c |
| D, d | D | D | D | D | d | d | d | d |
| E, e | E | E | E | E | e | e | e | e |
| F, f | F | F | F | F | f | f | f | f |
| G, g | G | G | G | G | g | g | g | g |
| Resultado | s | t | U | v | w | x | Y | z |

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

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

5.2.2. Métodos Microbiológicos

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

Exactitud: este indicador nota el grado de acuerdo o falta de incertidumbre, entre lo observado y los valores verdaderos. Es estimado por el uso de cultivos de referencia comparado al nuevo método,



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 16 de 23 | |

esto es llamado porcentaje de recuperación.

Precisión/repetibilidad: es el grado de acuerdo entre las réplicas de los análisis o mediciones bajo las mismas condiciones. Usar un microorganismo específico o la densidad de un grupo microbiano que al menos sea el 75% positivo, pudiéndose detectar suficientes respuestas. El criterio de aceptación es el coeficiente de variación $\leq 5\%$.

Precisión/reproducibilidad: la prueba se desarrolla en dos días. En el día 1 dos analistas deben realizar el análisis de una muestra en condiciones semejantes, en el día 2, los mismos analistas ejecutan el ensayo bajo condiciones diferentes. El criterio de aceptación es el coeficiente de variación $\leq 10\%$.

Recuperación/Sensibilidad: capacidad del método para detectar al microorganismo de estudio o un componente de la misma matriz de estudio. Determinado por el análisis de suficientes muestras utilizando al menos 2 adiciones de suspensiones del microorganismo objeto o aumentando o disminuyendo el volumen de la muestra o dilución analizada, seguido de un análisis estadístico confiable.

Límite de detección: este indicador muestra la densidad más baja del microorganismo que puede ser determinada. Se determina usando diluciones de los cultivos de referencia y midiendo la recuperación entre réplicas de cada dilución. Se especifica en cada método de referencia. Se aplica generalmente a métodos cualitativos. Su estimación deberá realizarse sobre muestras naturales con carga baja del microorganismo a estudiar o, en su defecto, con muestras inoculadas preferiblemente no esterilizadas para que exista microbiota interferente.

Límite de cuantificación: puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se aplica a métodos cuantitativos.



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 17 de 23 | |

Límite superior: este indicador revela el nivel en cuyas mediciones cuantitativas no llegan a ser confiables (sobrepoblación de colonias típicas y atípicas). Se especifica en cada método de referencia.

Rango: indica el intervalo entre el límite de detección y límite superior.

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

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

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

5.3. CÁLCULOS Y RESULTADOS

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

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

H0: Los datos siguen una distribución normal.



| | | |
|---|----------------------|---------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 18 de 23 | |

H1: Los datos no siguen una distribución normal.

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

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

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

Donde, **x** es el dato sospecho (máximo o mínimo), **x_{prom}** es el promedio de los valores y **s** es la desviación estándar.

El valor obtenido es comparado con el valor crítico del test de Grubbs al 98,5% (Tabla 3)

Tabla 3. Valor crítico del test de Grubbs al 98,5% de confianza

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



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 19 de 23 | |

Límite de detección instrumental (LDI):

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

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

Límite de Detección Método (LDM):

Nivel de detección verdadero estimado.

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

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

F = (Estimación entre 1-5 veces)

S_{Blancos} = Desviación estándar de los blancos.

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

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

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

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

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

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



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 20 de 23 | |

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

x = Promedio de los resultados determinados experimentalmente,

s = Desviación estándar.

Exactitud: En términos relativos en porcentaje.

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

x = Promedio de los resultados determinados experimentalmente,

x ref = Valor verdadero.

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

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

Porcentaje de Recuperación

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

LFM = Concentración de la matriz fortificada

A = Alícuota adicionada del patrón (Spike vol)



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 21 de 23 | |

B = Volumen de muestra (Sample vol)

C = Concentración muestra sin fortificar (sample conc)

D = Volumen total matriz fortificada

E = Concentración del patrón (Spike slution conc)

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

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

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

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

Incertidumbre: Utilizando la desviación estándar y la incertidumbre asociada a los equipos de medición realizar la estimación de la incertidumbre.

Manejo de Datos Microbiológicos

Distribución de poblaciones bacterianas: Los datos microbiológicos pueden tener amplios rangos de incertidumbre debido a que las muestras no son homogéneas y las características de las bacterias son variables. La distribución microbiana no es necesariamente simétrica y rara vez se ajustan a una curva de distribución normal.

La distribución del microorganismo en una muestra puede ser natural y exclusiva para una muestra y matriz.



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 22 de 23 | |

- En el recuento puede encontrarse más de una célula bacteriana o fúngica.
- Los recuentos dependen también del medio, condiciones de incubación, potencial de crecimiento.
- Los datos deben ser convertidos a log decimales, para tener una distribución más simétrica.
- Distribución de Poisson.
- Medidas de tendencia central de distribución sesgada: Poisson indica la probabilidad de observar el organismo de interés; Media geométrica: el número más probable de un microorganismo en una muestra.

5.4. ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE DOCUMENTOS – INFORME

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

Plan de confirmación o validación de métodos: formato donde se debe incluir la preparación de reactivos, estándares, muestras y matriz fortificadas de acuerdo con el tiempo de vida útil de cada uno y la estabilidad del analito. Este plan deberá ser presentado para revisión previa al técnico de calidad.

- Informe de confirmación o validación: es una descripción breve de todo el proceso de confirmación o validación realizado y que debe contener los siguientes numerales: fecha de ensayo, referencia del método empleado; objetivo, metodología (reactivos, equipos, materiales, condiciones de trabajo, procedimiento), análisis estadístico de los resultados, Incertidumbre, conclusiones y cuadro de parámetros de confirmación o validación. Utilizar el STLABFO-10 Informe de Confirmación y/o Validación de Métodos (Impreso y digital). El cálculo de la incertidumbre se debe reportar respectivamente siguiendo el instructivo de determinación de la incertidumbre vigente.
- Carpeta de soporte técnico: contiene todos los documentos originales producidos durante el proceso de confirmación o validación, las notas y observaciones del analista, Registro de datos primarios para la confirmación y validación de Métodos STLABFO-28, cálculos, y demás información que permita la revisión del proceso o su replicación por otro analista o por otro laboratorio. Estos documentos deben ser almacenados en orden cronológico.
- Instructivo de ensayo: con los datos de la validación incluidos y las modificaciones y precisiones



| | | |
|--|-----------------------------|----------------------|
| SERVICIUDAD E.S.P. | Código STLABIN-18 | Versión 01 |
| Instructivo para la Confirmación y/o Validación de Métodos | Página 23 de 23 | |

que se hayan incluido al método original, generar el instructivo de ensayo

- Parámetros de confirmación o validación: corresponde al cuadro parámetros de confirmación o validación del método en medio impreso y magnético. Si alguno de los parámetros no aplica, digite en la casilla la sigla N.A

6. REGISTROS

STLABFO-10 Informe de Confirmación y/o Validación de Métodos

STLABFO-28 Registro de datos primarios para la confirmación y validación de Métodos

7. ANEXOS

7.1. BIBLIOGRAFIA

Norma Técnica Colombiana NTC-ISO/IEC 17025 .

American Public Health Association (APHA). Standard Methods of Water and Wastewater. 23 ed. American Public

Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation publication. APHA, 2017, Washington D.C.

Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016). Consultado en agosto de 2023, disponible en www.eurachem.org”.

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

Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos Generales sobre la Validación de Métodos”. Santiago, 2010. Consultado en agosto del 2023, disponible en: <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia_tecnica_1_validacion_de_metodos.pdf>>.