

## TABLA DE CONTENIDO

1.	OBJETIVO .....	1
2.	ALCANCE .....	1
3.	DOCUMENTOS DE REFERENCIA.....	2
4.	TERMINOS Y DEFINICIONES.....	3
5.	INTRODUCCIÓN .....	8
6.	REQUISITOS GENERALES .....	8
7.	SELECCIÓN DE MÉTODOS.....	9
8.	PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN.....	10
9.	REVALIDACIONES Y VERIFICACIONES DE SEGUIMIENTO .....	15
10.	REQUISITOS PARTICULARES PARA MÉTODOS DE ENSAYO COMERCIALES – KITS DE ANÁLISIS.....	16
11.	SOFTWARE.....	17
12.	ANEXOS.....	18
A.	Lineamientos para la evaluación de ciertos parámetros de desempeño del método .....	18
B.	Traducción del “Anexo D – Notas sobre ensayos cualitativos” de la Guía Eurachem “Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014)”.....	20
13.	IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS .....	23

### 1. OBJETIVO

Establecer los lineamientos que deben cumplir los laboratorios con respecto a la validación y verificación de los diferentes métodos de ensayo, sean métodos normalizados, métodos normalizados utilizados fuera del alcance previsto, métodos no normalizados o métodos desarrollados y diseñados por el laboratorio.

### 2. ALCANCE

Todos los laboratorios acreditados o en proceso de acreditación bajo las normas OHN-ISO/IEC 17025 y OHN-ISO 15189.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:	Fecha de entrada en vigencia:
Gestoría de Calidad	Secretarías de Acreditación	Coordinación Técnica del OHA	

### 3. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

- |      |  |   |
|------|--|---|
| [1]  | <b>OHN-ISO/IEC 17025</b>                   | Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración  |
| [2]  | <b>ISO 15189</b>                           | Laboratorios Clínicos – Requisitos para la calidad y la competencia   |
| [3]  | <b>OHA-MC-P02</b>                          | Política sobre la trazabilidad de las mediciones  |
| [4]  | <b>OHA-MC-P03</b>                          | Política para la estimación de la incertidumbre   |
| [5]  | <b>JCGM 200:2012 VIM</b>                   | Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)   |
| [6]  | <b>Documento elaborado por CENAM y ema</b> | Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico  |
| [7]  | <b>JAS-P08</b>                             | Policy for validation of Test Methods   |
| [8]  | <b>ECA-MC-PO01</b>                         | Política de Validación de Métodos   |
| [9]  | <b>ECA-MC-PO01-G01</b>                     | Guía para la validación de Métodos  |
| [10] | <b>CLSI EP9-A2</b>                         | Method comparison and bias estimation using patient samples   |
| [11] | <b>IEC 60050</b>                           | International Electrotechnical Vocabulary   |
| [12] | <b>EURACHEM/CITAC QUAM:2012.P1</b>         | Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement   |
| [13] | <b>SEQC – Evaluación de Métodos (I)</b>    | Curso de Estadística para el laboratorio Clínico; Módulo 3: Control de la calidad analítica y evaluación de métodos analíticos,<br>Archivo adjunto: Evaluación de Métodos (I) |
| [14] | <b>Q2(R1)</b>                              | Validation of analytical procedures: text and methodology - ICH Harmonized Tripartite Guideline   |
| [15] | <b>CLSI C24-A3</b>                         | Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions; Approved Guideline   |
| [16] | <b>OHN-ISO/IEC 17043:2010</b>              | Evaluación de la conformidad – Requisitos generales para los ensayos de aptitud   |
| [17] | <b>RTCA 11.03.39:06</b>                    | Productos Farmacéuticos. Validación de métodos para la evaluación de la calidad de los medicamentos.  |
| [18] | <b>La Guía MetAs</b>                       | ¿Calibración, Verificación o Caracterización de Sistemas Termales e Higrostats? Año 05 #8, Agosto-2005  |

#### 4. TERMINOS Y DEFINICIONES

**Validación**, verificación de que los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto. [5]

**Ejemplo:** *Un procedimiento de medida, habitualmente utilizado para la medición de la concentración en masa de nitrógeno en agua, puede también validarse para la medición en el suero humano.*

**Verificación**, aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados. [5]

**Ejemplo 1:** *la confirmación de que un material de referencia declarado es homogéneo para el valor y el procedimiento de medida correspondientes, para muestras de masa de valor hasta 10 mg.*

**Ejemplo 2:** *la confirmación de que se satisfacen las propiedades de funcionamiento declaradas o los requisitos legales de un sistema de medida.*

**Ejemplo 3:** *la confirmación de que puede alcanzarse una incertidumbre objetivo.*

**Nota 1:** *cuando sea necesario, es conveniente tener en cuenta la incertidumbre de medida.*

**Nota 2:** *el elemento puede ser, por ejemplo, un proceso, un procedimiento de medida, un material, un compuesto o un sistema de medida.*

**Nota 3:** *los requisitos especificados pueden ser, por ejemplo, las especificaciones del fabricante.*

**Nota 4:** *en metrología legal, la verificación, tal como la define el VIML [53], y en general en la evaluación de la conformidad, puede conllevar el examen, marcado o emisión de un certificado de verificación de un sistema de medida.*

**Nota 5:** *no debe confundirse la verificación con la calibración. No toda verificación es una validación.*

**Nota 6:** *en química, la verificación de la identidad de una entidad, o de una actividad, requiere una descripción de la estructura o las propiedades de dicha entidad o actividad.*

**Patrón de medida:** realización de la definición de una magnitud dada, con un valor determinado y una incertidumbre de medida asociada, tomada como referencia. [5]

**Ejemplo:** *Patrón de masa de 1 kg, con una incertidumbre típica asociada de 3  $\mu$ g.*

**Material de referencia: (MR)** material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas.[5]

**Material de referencia certificado: (MRC)** material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de

propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos. [5]

**Incertidumbre de medida:** parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza. [5]

**Precisión de medida:** proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas. [5]

**Repetibilidad de medida:** precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad. [5]

**Condición de repetibilidad de una medición:** condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo. [5]

**Reproducibilidad de medida:** precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de reproducibilidad. [5]

**Condición de reproducibilidad de una medición:** condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye diferentes lugares, operadores, sistemas de medida y mediciones repetidas de los mismos objetos u objetos similares. [5]

**Selectividad de un sistema de medida:** propiedad de un sistema de medida, empleando un procedimiento de medida especificado, por la que el sistema proporciona valores medidos para uno o varios mensurandos, que son independientes de otros mensurandos o de otras magnitudes existentes en el fenómeno, cuerpo o sustancia en estudio.[5]

**Ejemplo:** Aptitud de un sistema de medida que incluye un espectrómetro de masas para medir la relación de las corrientes iónicas producidas por dos compuestos específicos, sin perturbaciones de otras fuentes específicas de corriente eléctrica.

**Linealidad** (de un instrumento de medida): capacidad de un instrumento de medición para proporcionar una indicación que tenga una relación lineal con una magnitud determinada distinta de una magnitud de influencia.

**Nota:** el método de expresión de la falta de linealidad es diferente para los distintos tipos de instrumentos y se establece en cada caso particular. [IEV 311-06-05 ref. 11]

En el contexto de validación de métodos de química analítica EURACHEM y CITAC 2012 exponen lo siguiente:

La linealidad es una propiedad importante de los métodos utilizados para efectuar mediciones en un intervalo de concentraciones. La linealidad de la respuesta a patrones puros (MRC) y a muestras realistas puede determinarse. La linealidad generalmente no es cuantificada pero es comprobada mediante inspección o utilizando pruebas de significancia de la no linealidad. La no linealidad significativa es usualmente corregida mediante el uso de funciones de calibración no

lineal o eliminada seleccionando un intervalo de operación más restringido. Cualquier desviación residual de la linealidad normalmente es contabilizada por el estimado de la precisión global cubriendo varias concentraciones, o dentro de cualquier incertidumbre asociada a la calibración. [12]

**Límite de detección**, valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad  $\beta$  de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad  $\alpha$  de declarar erróneamente su presencia.[5]

**Nota:** No debe utilizarse el término “sensibilidad” en lugar de “límite de detección”.

**Límite de cuantificación** (LOQ por sus siglas en inglés), es la menor concentración real a la cual el analito es detectado con confiabilidad y a la cual la incertidumbre del resultado observado es menor o igual que el límite establecido para la incertidumbre, por el laboratorio o por el fabricante del método. Los objetivos para la incertidumbre (o para el sesgo o la imprecisión) deben obtenerse de las especificaciones del método, o estar disponibles a partir de los registros del laboratorio. [13]

**Veracidad de medida:** proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia. [5]

**Nota 1:** La veracidad de medida no es una magnitud y no puede expresarse numéricamente, aunque la norma ISO 5725 especifica formas de expresar dicha proximidad.

**Nota 2:** La veracidad de medida está inversamente relacionada con el error sistemático, pero no está relacionada con el error aleatorio.

**Nota 3:** No debe utilizarse el término exactitud de medida en lugar de “veracidad de medida” y viceversa.

**Intervalo de medida:** conjunto de los valores de magnitudes de una misma naturaleza que un instrumento o sistema de medida dado puede medir con una incertidumbre instrumental especificada, en unas condiciones determinadas.[5]

**Nota 1:** En ciertas magnitudes, se utilizan los términos “rango de medida” o “campo de medida”.

**Nota 2:** No debe confundirse el límite inferior de un intervalo de medida con el límite de detección.

**Robustez:** Es la medición de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas, variaciones en los parámetros del método. Provee una indicación de la fiabilidad del método durante su uso cotidiano. [14]

En el contexto de validación de métodos de química analítica EURACHEM y CITAC 2012 exponen lo siguiente:

Muchos protocolos de validación o de desarrollo de métodos requieren que la sensibilidad a parámetros particulares sean investigados directamente. Esto se hace usualmente con un “examen de robustez” preliminar, en el cual el efecto de cambios en uno o más parámetros es observado. Si fuese significativo, en comparación con la precisión del examen de robustez, un estudio más detallado se lleva a cabo para medir el tamaño del efecto y determinar un intervalo

de trabajo acorde. Los datos del examen de robustez proveen de información sobre el efecto de parámetros importantes. [12]

**Caracterización:** Conjunto de operaciones que determinan las diferentes características metrológicas y especificaciones de operación de un equipo: instrumento de medición, sistema de medición, o medida materializada. [18]

**Error Máximo Permitido:(EMP)**valor extremo del error de medida, con respecto a un valor de referencia conocido, permitido por especificaciones o reglamentaciones, para una medición, instrumento o sistema de medida dado[5]

*Nota 1:* En general, los términos “errores máximos permitidos” o “límites de error” se utilizan cuando existen dos valores extremos.

*Nota 2:* No es conveniente utilizar el término “tolerancia” para designar el ‘error máximo permitido’.

**Error aleatorio de medida:** componente del error de medida que, en mediciones repetidas, varía de manera impredecible. [5]

*Nota:* El valor de referencia para un error aleatorio es la media que se obtendría de un número infinito de mediciones repetidas del mismo mensurando.

**Error sistemático de medida:** componente del error de medida que, en mediciones repetidas, permanece constante o varía de manera predecible. [5]

*Nota 1:* El valor de referencia para un error sistemático es un valor verdadero, un valor medido de un patrón cuya incertidumbre de medida es despreciable, o un valor convencional de una magnitud.

*Nota 2:* El error sistemático y sus causas pueden ser conocidas o no. Para compensar un error sistemático conocido puede aplicarse una corrección.

**Corrida Analítica:** (también llamada **Corrida intraserial o intradía**) un intervalo (periodo de tiempo o una serie de mediciones) que se lleva a cabo dentro o entre dos resultados de pruebas de control de calidad consecutivas; entre las cuales se espera que la precisión y la exactitud del sistema de medición se mantengan estables.<sup>1</sup>

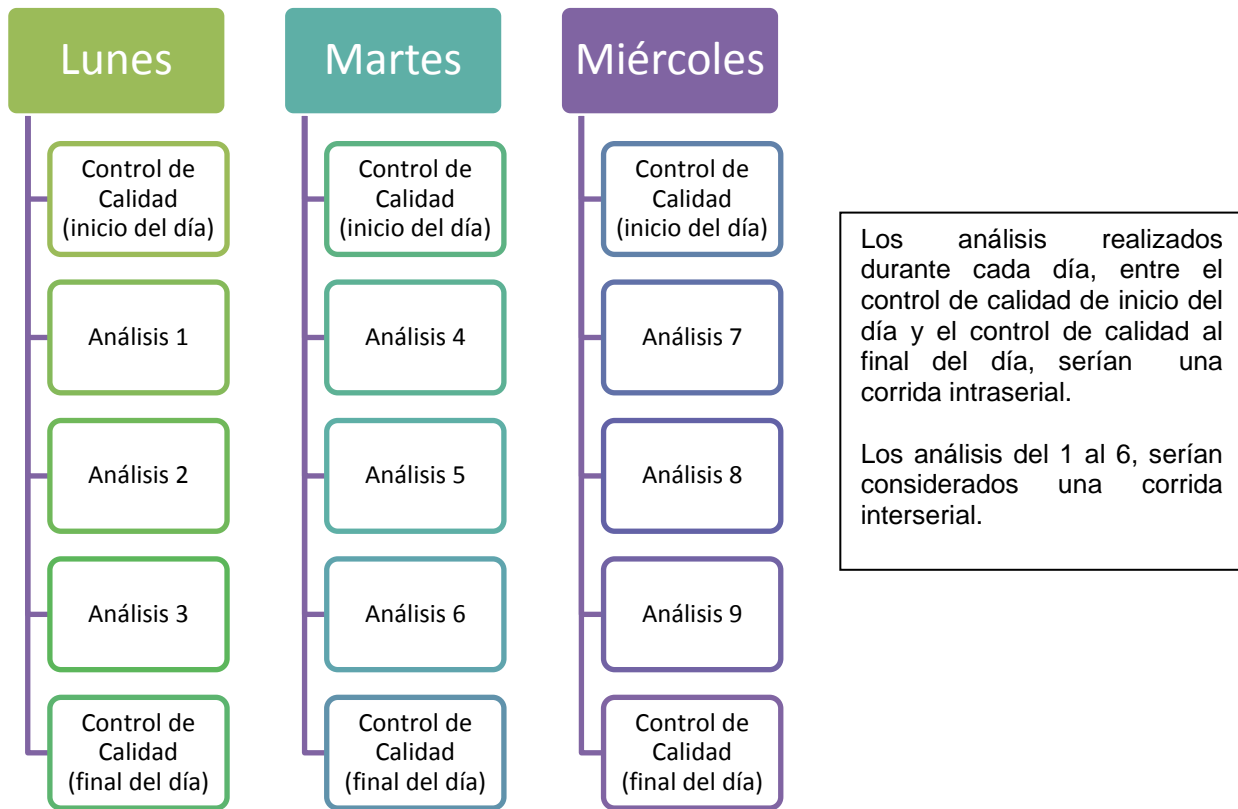
*Nota:* esta definición es aplicable para laboratorios clínicos. (Ver anexo punto 2.5)

**Corrida interserial:** un intervalo (periodo de tiempo o una serie de mediciones) que se lleva a cabo entre resultados de pruebas de control de calidad no consecutivas.<sup>2</sup>

*Nota:* esta definición es aplicable para laboratorios clínicos. (Ver anexo punto 2.5)

<sup>1</sup> Definición redactada por el Comité Asesor de Laboratorios y Organismos de Inspección y el Comité Ad Hoc para la política del OHA para la Validación de Métodos.

<sup>2</sup> Ídem.



**Puntos de decisión clínica<sup>3</sup>:** La concentración del analito donde la interpretación clínica es crítica para el cuidado del paciente. Pueden existir diferentes puntos de decisión clínica para un analito en particular. Dichas concentraciones deberían proveer guía en la selección de estimados relevantes de imprecisión estable, inexactitud estable e inexactitud en la matriz.

**Comparación interlaboratorios:** organización, realización y evaluación de mediciones o ensayos sobre el mismo ítem o ítems similares por dos o más laboratorios de acuerdo con condiciones predeterminadas. [16]

<sup>3</sup>Tomado de: Westgard Web - Home of Westgard QC, Inc. Tools, Technology and Training for healthcare laboratory professionals; WQC GLOSSARY, GLOSSARY OF QC TERMS, <http://www.westgard.com/glossary.htm>

## 5. INTRODUCCIÓN

La validación comprueba la aptitud de los procesos de examen y refleja las condiciones reales de la aplicación de los mismos; en otras palabras, es el proceso mediante el cual se obtiene evidencia documentada y demostrativa de que un método es reproducible y fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos o parámetros definidos y para el propósito requerido.

La realización de las actividades de validación y verificación de los procedimientos utilizados por el propio laboratorio, contemplan la satisfacción de las necesidades metrológicas requeridas por los clientes.

El laboratorio debe evaluar los diferentes métodos disponibles y seleccionar aquel que mejor se adecúe a las necesidades y los recursos del caso. El método seleccionado debe haber sido validado o verificado, según corresponda, como parte de su desarrollo.

La validación del método debe reflejar las condiciones reales de la aplicación de los mismos; esto puede conseguirse utilizando, por ejemplo, muestras comerciales o preparadas en el laboratorio con un nivel conocido de la especie o analito de interés. El analista debe considerar que una muestra preparada en la matriz de interés solo imita parcialmente a una muestra real; no obstante, en muchos casos, ésta es la mejor y la única opción disponible.

El uso de patrones o materiales de referencia para la validación de los métodos debe seguir los lineamientos indicados en la **OHA-MC-P02 Política sobre la trazabilidad de las mediciones**.

Esta política contiene criterios y lineamientos complementarios a los establecidos en el documento **OHA-MC-P03 Política sobre la incertidumbre de las mediciones**.

El OHA hace notar que existen numerosas publicaciones y procedimientos para la validación y verificación de métodos, y no existe un único procedimiento universalmente acordado.

## 6. REQUISITOS GENERALES

**6.1** El laboratorio debe contar con procedimientos o políticas para la validación de métodos, estos documentos deben considerar todos los requisitos establecidos en la norma OHN-ISO/IEC 17025, en la norma OHN-ISO 15189 y en esta política.

**6.2** El laboratorio debe contar con personal capacitado para realizar la validación y verificación de métodos. El laboratorio debe contar con los registros documentales que sustenten este requisito.

**6.3** La validación puede ser subcontratada, mediante servicios de asesoría o consultoría, siempre y cuando le siga una verificación realizada por el laboratorio para asegurar que el método es apto para su uso.



- 6.4** La verificación no puede ser subcontratada, debe ser realizada en sitio bajo la responsabilidad del laboratorio.
- 6.5** La validación idealmente debería llevarse a cabo antes de introducir un nuevo método de ensayo al laboratorio
- 6.6** El laboratorio debe validar o verificar todos los métodos, en el alcance a acreditar, que no hayan sido previamente validados.
- 6.7** Si el laboratorio tiene métodos validados (o verificados) previamente debe presentar evidencia de que esas validaciones (o verificaciones) cumplan con los requisitos descritos en esta política y que sean actualmente técnicamente válidas.
- 6.8** Si un método se va a utilizar con múltiples aplicaciones, se deben realizar cuantas validaciones sean requeridas para cada aplicación.

**Ejemplo:** *La técnica Limulusamebocytelysate (LAL) puede ser utilizada en múltiples aplicaciones en investigación y en industria; algunas de las aplicaciones son la detección de endotoxinas en productos farmacéuticos, detección de bacterias Gram negativas para la calidad del agua para consumo humano o en aguas residuales tratadas, para el control de calidad de la carne cruda y de derivados cárnicos, etc. Si un laboratorio implementa, dentro del alcance a acreditar, varias de las aplicaciones de este método, para cumplir con esta política tendría que realizar una validación para cada aplicación.*

**Nota:** *al repetir validaciones para el mismo método con diferentes aplicaciones, se entiende que existen parámetros de desempeño con comportamientos similares para ambas aplicaciones y que no es necesario repetir los estudios de cada uno de ellos para cada aplicación.*

- 6.9** Para laboratorios acreditados, cuando se modifiquen, actualicen o sustituyan métodos acreditados, antes de que se pueda incluir la nueva versión del método en el alcance de la acreditación el caso debe ser analizado por el OHA. El laboratorio debe notificar el cambio inmediatamente a la secretaria de acreditación del OHA quien determinará, de acuerdo a la extensión del cambio, cuáles serán las acciones a seguir.

**Nota:** *Los laboratorios de productos farmacéuticos deberían tomar en consideración el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.39:06 – Productos Farmacéuticos. Validación de métodos para la evaluación de la calidad de los medicamentos.*

## **7. SELECCIÓN DE MÉTODOS**

- 7.1** Es responsabilidad del laboratorio utilizar los métodos apropiados de acuerdo al propósito previsto, según el alcance requerido. Estos métodos pueden ser métodos normalizados, métodos normalizados con modificaciones, métodos no normalizados o métodos desarrollados por el propio laboratorio. El laboratorio de común acuerdo con el cliente, puede seleccionar los métodos utilizando su propio criterio o utilizar aquellos métodos normalizados vigentes en el país.

**7.2** Los métodos de ensayo comerciales, llamados también kits de análisis, siguen todos los lineamientos de esta política. Estos también se pueden clasificar como métodos normalizados, métodos normalizados con modificaciones, métodos no normalizados o métodos desarrollados por el propio laboratorio. Se consideran normalizados, aquellos métodos de ensayos comerciales que han sido reconocidos por instituciones internacionalmente renombradas o mediante estudios colaborativos internacionales.

**Nota 1:** se describen otros lineamientos particulares acerca de los métodos de ensayo comerciales en el punto 10 de esta política.

**Nota 2:** Como simplificación, esta política incluirá el término de “métodos de ensayo comerciales” dentro del término “método de ensayo”.

**7.3** El laboratorio debe validar los siguientes métodos

- a) Los métodos no normalizados.
- b) Métodos desarrollados por el laboratorio.
- c) Métodos normalizados que hayan sido modificados para su uso dentro del laboratorio.
- d) Métodos normalizados usados fuera del alcance aprobado.

**7.4** El OHA considera como métodos normalizados aquellos emitidos por organismos de normalización internacionales (ej. ISO), regionales (ej. normas europeas EN), o nacionales como ASTM, BS, DIN, AFNOR, IRAM, por ejemplo. También se consideran como normalizados aquellos métodos emitidos por organizaciones internacionalmente reconocidas como EPA, AOAC, Standard Methods, USP, EP, APHA, BAM-FDA, CLSI y CLIA, por ejemplo. Algunos de los programas de reconocimiento internacional para métodos de análisis comerciales (kits de análisis) son, por ejemplo, el Official Methods of Analysis (OMA) o el Performance Tested Methods (PTM); organizados por la AOAC<sup>4</sup>.

**Nota:** cualquier otra fuente de métodos normalizados será revisada y aprobada por el OHA.

**7.5** Los laboratorios que utilizan métodos normalizados, sin ninguna modificación, para los que se declara parámetros de desempeño, deben realizar una verificación de la validación. Lo anterior implica demostrar mediante examen que las condiciones de su equipo, personal, condiciones ambientales, entre otros, les permite alcanzar los mismos niveles de excelencia que los declarados en el método normalizado. (Ver punto 9.5 y 9.6)

## **8. PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN**

**8.1** La rigurosidad de la validación se debe basar en datos científicos o razonamientos que especifiquen claramente porque se incluyó o excluyó una característica o un parámetro particular de la validación; además, la extensión de la validación depende de la naturaleza de los datos que han sido determinados como esenciales para demostrar la adecuación del ensayo para su uso previsto.

---

<sup>4</sup> [www.aoac.org](http://www.aoac.org)

**Ejemplo:** Si un laboratorio implementa un método de ensayo normalizado, pero modifica el tamaño de la muestra, es posible que los parámetros más relevantes a validar sean repetibilidad y reproducibilidad, en cambio si el laboratorio lo que modifica es el equipo o los reactivos es probable que sea necesaria una validación más exhaustiva de los parámetros de desempeño. (Ver punto 8.3.3).

**Cada validación de métodos consta de tres etapas:**

**8.2 Etapa I: Establecimiento del protocolo de validación**, este debe contener al menos la siguiente información:

- a) **Una identificación única**
- b) **Objetivo**
- c) **Alcance** (delimitando el tipo de muestra, matriz, analito, rango de concentración, técnica analítica, etc.)
- d) **Responsables**, debidamente autorizados para tal fin.
- e) **Procedimientos** indicando que parámetros se han de validar y cómo será su determinación.
- f) **Los procedimientos de muestreo**, si aplica.
- g) **Equipos** involucrados en la validación (documentar sus condiciones metrológicas).
- h) **Descripción del método analítico** La descripción debe ser tal cual se va a usar rutinariamente dentro del laboratorio; se debe hacer énfasis en los puntos críticos de la metodología, en la verificación de la idoneidad de las condiciones operatorias definidas y fórmulas para el cálculo de resultados. Se debe incluir los siguientes elementos: reactivos y su preparación, patrones, materiales, instrumentos, condiciones ambientales, medidas de seguridad, muestras y su preparación, procedimiento y cálculos.
- i) **Criterios de Aceptación** se deben establecer con anterioridad para cada uno de los parámetros a evaluar, basándose en las necesidades o finalidad del método y en la información recogida durante la fase de desarrollo del procedimiento analítico.

**8.2.1** Uno de los criterios de aceptación puede ser la incertidumbre combinada deseada; la incertidumbre asociada a la precisión del método (Repetibilidad y Reproducibilidad) no debería exceder la incertidumbre combinada deseada.

**Ejemplo de criterio de aceptación para uno de los parámetros**

Parámetro de Desempeño		Límites de Aceptación
Precisión	Coeficiente de variación	$\leq 2\%$
Linealidad	Coeficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	$\geq 0.98$
	Pendiente	$\neq 0$

**8.3 Etapa II: Realización de la validación**, una vez aprobado el protocolo se procede con la validación de acuerdo al mismo. Aquí se incluye el proceso de cálculo estadístico de los distintos parámetros evaluados.

**8.3.1 Los parámetros típicos a evaluar durante una validación de un método de ensayo se enumeran a continuación:**

- a) Selectividad
- b) Linealidad (se debe tomar en cuenta el análisis de residuales)
- c) Límite de detección
- d) Límite de cuantificación
- e) Precisión (Repetibilidad, Reproducibilidad y precisión intermedia)
- f) Veracidad (sesgo, recuperación)
- g) Rango de trabajo
- h) Robustez
- i) Incertidumbre de la medición
- j) Caracterización (equipos, patrones, condiciones)

**Nota 1:** ver los anexos para más información.

**8.3.1.1** Los parámetros que se deben evaluar para la validación de un método dependerán del tipo de método, de las características del mismo y de los lineamientos que se dan en esta política. No siempre será necesario evaluar todos los parámetros listados en el punto 8.3.1.

**Nota:** La incertidumbre de la medición usualmente no es un parámetro de validación en sí misma, pero usualmente se evalúa simultáneamente al proceso de confirmación de métodos.

**8.3.1.2** Los ensayos cualitativos no tienen que estimar la incertidumbre mediante un método directo, en concordancia con el **OHA-MC-P03 Política para la Estimación de la Incertidumbre**, ya que aún no se ha desarrollado un método por la comunidad científica internacional para ellos; pero, el laboratorio como parte de la validación debe:

- a. determinar la probabilidad de error en el resultado que emite, es decir, la probabilidad de falsos positivos y falsos negativos;
- b. identificar fuentes de incertidumbre del ensayo y establecer los mecanismos para controlarlas.
- c. Ver Anexo B de esta política.

### 8.3.2 Alcance de Validación según el tipo de método

Método	Alcance de Validación
Normalizado	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Verificación de algunos parámetros de desempeño, como mínimo lo indicado en el punto 9.5</li> <li>* Verificación de otros parámetros de desempeño, según apliquen (ver punto 9.6)</li> <li>* Una posibilidad para evaluar veracidad es la participación en ensayos de aptitud o en rondas de comparación.</li> </ul>
	Uno de los criterios de aceptación del laboratorio para métodos normalizados debe ser una variabilidad menor o igual a los valores de referencia declarados por el método normalizado.
Normalizado Modificado o fuera del alcance	Dependiendo de las modificaciones realizadas al método, el laboratorio debe decidir que parámetros de validación deben ser evaluados, ver punto 8.3.3.
No normalizado o desarrollado por el laboratorio	Se deben evaluar todos los parámetros estadísticos posibles según las características del método, ver punto 8.3.4.

Adaptado de "guía para la validación de métodos de ensayo", OAA, GUI-LE-03, junio 2013, pg. 8, tabla 1.

### 8.3.3 Parámetros de desempeño MÍNIMOS a revalidar cuando se utiliza un método normalizado modificado o fuera del alcance

Modificación	Parámetros a Revalidar
Método de extracción	Selectividad y veracidad (o recuperación)
Matriz de muestra	Selectividad, veracidad (o recuperación), límite de detección y límite de cuantificación
Rango de trabajo	Linealidad
cambios en condiciones experimentales (pH, condiciones ambientales)	Robustez (caracterización, para laboratorios de calibración)
Sistema de detección	Selectividad, linealidad y rango de trabajo
Cambio de patrones, equipos, reactivos	Cuando aplique, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango de trabajo y selectividad

Adaptado de "guía para la validación de métodos", ECA, ECA-MC-PO01-G01, diciembre 2012, pg. 5, cuadro 2.

### 8.3.4 Parámetros de desempeño MÍNIMOS a validar cuando se utiliza un método no normalizado

Parámetro	Tipo de determinación				
	Cualitativo	Cuantitativo			
		Componentes Trazas <sup>2</sup>	Componentes Mayoritarios <sup>3</sup>	Propiedad física	Calibración
Selectividad	si	si	si	no	no
Linealidad	no	si	si aplica	si aplica	no
Límite de Detección	si <sup>1</sup>	si	si aplica	no	no
Límite de Cuantificación	no	si	si aplica	no	no
Precisión	no	si	si	si	si
Veracidad	no	si	si	si	si
Rango de trabajo	no	si	si	si	si
Robustez	si	si	si	si	no
Caracterización	no	no	no	no	si
Incertidumbre	no*	si aplica <sup>4</sup>	si aplica <sup>4</sup>	si	si

1. En los casos que aplique, por ejemplo, en ensayos microbiológicos

2. Incluye ultratrazas

3. Incluye componentes minoritarios

4. Generalmente es aplicable para ensayos fisicoquímicos.

\* Ver punto 8.3.1.2

Adaptado de "guía para la validación de métodos", ECA, ECA-MC-PO01-G01, diciembre 2012, pg. 5, cuadro 2.

### 8.4 Etapa III: Elaboración del informe de validación; el informe debe contener lo siguiente:

- a. Copia del protocolo de validación o una referencia al mismo
- b. Resultados analíticos; se debe incluir una tabla comparativa donde se detallen los valores obtenidos contra los criterios de aceptación, previamente determinados en el protocolo de validación.
- c. Resultados Estadísticos
- d. Estimación de la Incertidumbre Expandida del método validado, si aplica.
- e. Interpretación de los resultados
- f. Conclusiones
- g. Criterios de revalidación
- h. Declaración de Aptitud del Método, de acuerdo a la adecuación del método de ensayo.

- 8.4.1** Se deben conservar todos los resultados iniciales de la validación, incluyendo aquellos resultados fuera de especificación.
- 8.4.2** Se debe incluir los resultados de calibración de los equipos pre validación y evidencia de que los equipos se han mantenido en estado de calibración durante todo el proceso. El laboratorio debe demostrar una gestión metrológica adecuada que cumpla con los requisitos de la norma aplicable y los requisitos del **OHA-MC-P02 Política sobre la trazabilidad de las mediciones.**
- 8.5** Si por medio del análisis de los resultados de la validación se determina que el método no es adecuado técnicamente, ya que no cumple con los criterios de aceptación previamente establecidos, el laboratorio tiene dos opciones:
- Realizar un análisis de causas para determinar los parámetros que podrían estar afectando los resultados, realizar las modificaciones pertinentes al método de ensayo, y reiniciar el proceso de validación.
  - Concluir que el método no es adecuado para sus necesidades o las de sus clientes y sacar el método del alcance de acreditación.

**Nota:** *Un método que no es adecuado para cumplir con las necesidades del cliente no debería ser puesto en uso por ningún motivo.*

## **9. REVALIDACIONES Y VERIFICACIONES DE SEGUIMIENTO**

- 9.1** El laboratorio debe tener procedimientos o políticas para la revalidación y que determinen la frecuencia de las verificaciones de seguimiento de los métodos.
- 9.2** El laboratorio debe implementar un programa de verificaciones periódicas, observando y controlando el método de forma continua, usando herramientas estadísticas y de control de calidad adecuadas. Se debe evidenciar que se cumplen los parámetros de desempeño pre-establecidos.
- 9.3** Se debe repetir la validación de un método de ensayo cuando se realicen cambios mayores al mismo. Se consideran cambios mayores, cambio de equipo (cuando exista un cambio de metodología), mantenimiento mayor de equipo, entre otros. Se consideran cambios menores, la modificación del tamaño de muestra, cambio de analista, sustitución de reactivos, entre otros.
- 9.4** Las verificaciones deben ser realizadas como mínimo cuando:
- Antes de poner en uso los métodos para evidenciar si éstos cumplen con las características de desempeño en las condiciones del laboratorio.
  - Al realizar cambios a métodos no normalizados que ya hayan sido validados
  - Al haber un cambio de las condiciones ambientales mayor, un cambio de instalaciones, reemplazo del equipo (sin cambio de metodología).

**Por ejemplo:** *cambio del equipo por el modelo actualizado, cambio del equipo por el mismo modelo debido a avería, etc.*

- d) Al introducir métodos no utilizados rutinariamente, pero ya validados; incluyendo métodos normalizados.
- e) Al introducir nuevos lotes de patrones de referencia.
- f) Al obtener resultados no satisfactorios en ensayos de aptitud, cuando el análisis de causas determine que el problema se relaciona con la validación o verificación del método.
- g) Al obtener algún resultado no satisfactorio en alguno de los controles de calidad de los resultados del método.
- h) Al haber un cambio del personal responsable del método.
- i) Si se determina en una calibración post validación que un instrumento salió de su estado de calibración durante la validación de tal forma que ponga en duda la validez de los resultados del estudio.

**9.5** La verificación debe incluir, como mínimo, los siguientes parámetros:

- a) Precisión
- b) Veracidad
- c) Límite de cuantificación, (si aplica)
- d) Incertidumbre (si aplica)

**9.6** Si el laboratorio determina que existen otros parámetros relevantes o afectados, estos también deben ser verificados. En cambio, si el laboratorio considera que alguno de los parámetros no aplica al método seleccionado, esta decisión debe ser justificada técnicamente.

## **10. REQUISITOS PARTICULARES PARA MÉTODOS DE ENSAYO COMERCIALES – KITS DE ANÁLISIS**

**10.1** El laboratorio debe tomar en cuenta que muchos de estos kits de análisis son útiles como mediciones semicuantitativas o de campo, por lo que debe asegurarse que son aptos para cumplir con las necesidades o requisitos de sus clientes.

**10.2** Los laboratorios deben conservar los datos y registros pertinentes sobre los parámetros de desempeño de los sistemas de ensayos comerciales (kits) que utilicen, de preferencia remitidos por los fabricantes.

**10.3** Si el kit de análisis no incluye estos datos, el laboratorio debe solicitar los mismos a la casa comercial u otra instancia pertinente, conservando la evidencia documental de dicha solicitud. Si aun así no se obtienen dichos datos el laboratorio debe desarrollar procedimientos para calcular y evaluar los parámetros de desempeño necesarios para asegurar la confiabilidad del sistema de ensayo comercial.

**Nota 1:** Se recomienda que el laboratorio tenga como uno de sus criterios de selección y compra de métodos de ensayo comerciales, la disponibilidad de informes, datos o registros sobre los parámetros de desempeño de los métodos o la documentación completa de los estudios de validación de los kits.



**Nota 2:** Se recomienda que los estudios de validación se realicen con un mínimo de 30 muestras independientes para cada parámetro.

**Nota 3:** Se recomienda que los estudios de validación de los kits de análisis documenten al menos la selectividad, la especificidad, la probabilidad de detección a concentración cero, la reactividad cruzada y la probabilidad de detección a concentraciones de analito por encima del límite de decisión en un factor de 1.25 (en términos de la AOAC); particularmente para kits de análisis de drogas de abuso, y para otros kits comerciales según corresponda.

**10.4** Un método común para validar este tipo de métodos es mediante estudios colaborativos.

**10.5** El laboratorio que implementa un método analítico comercial es responsable de verificar su desempeño contra las especificaciones de la validación, antes de ponerlo en uso y durante su uso rutinario.

**10.6** Los métodos de ensayos comerciales normalizados únicamente deben hacer una verificación de los parámetros de desempeño. (Ver punto 8.3.2)

## **11. SOFTWARE**

De acuerdo a lo establecido en el punto 5.4.7.2 de la norma OHN-ISO/IEC 17025,

**11.1** Se considera que el software comercial que se utilice dentro del alcance de aplicación para el cual ha sido diseñado, ya fue validado; por ejemplo, Microsoft Word, Microsoft Excel, etc.

**11.2** Se deben validar las páginas de cálculo o el uso de macros.

**11.3** El laboratorio debe validar o revalidar todo software que haya sido reconfigurado o modificado.

**11.4** La validación de software para la gestión y/o procesamiento que haya sido creado por el laboratorio, software diseñado para el laboratorio (a la medida) o software desarrollado por otra entidad no reconocida internacionalmente, se debería llevar a cabo siguiendo los lineamientos de normas internacionales reconocidas sobre validación de métodos.

**11.5** El laboratorio debe establecer periodos para las verificaciones de seguimiento del software o de las hojas de cálculo.

## 12. ANEXOS

### A. Lineamientos para la evaluación de ciertos parámetros de desempeño del método

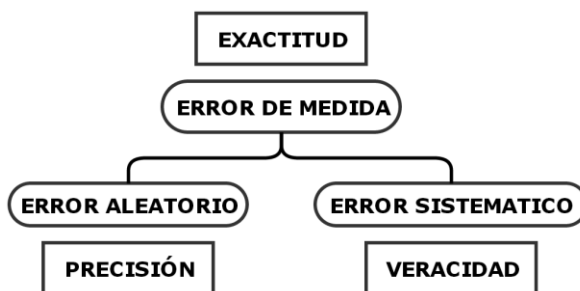
#### 1. Linealidad

- 1.1 Es importante evaluar dentro del intervalo analítico de los procedimientos de medición implementados por un laboratorio, los resultados máximo y mínimo que pueden ser reportados.
- 1.2 Para el caso de laboratorios clínicos, debe considerarse los puntos de decisión clínica, entendiéndose estos como las concentraciones o actividades de los analitos donde el médico decide entre administrar o no algún tratamiento terapéutico.
- 1.3 Al realizar las pruebas correspondientes, los resultados del sesgo o porcentaje de error deben ser menores que el error máximo permitido.
- 1.4 Para ensayos químicos los analitos deberían estar dentro del rango de trabajo con un suficiente margen de seguridad, ya que la interpretación de resultados en los extremos del rango de trabajo generalmente conlleva una probabilidad de error significativa.

#### 2. Precisión

- 2.1 Para conocer el valor de una magnitud se emplea un procedimiento de medición, los resultados que de este se obtengan son una estimación del valor del mensurando. Tal estimación contiene un error de medida, que es la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero del mensurando.
- 2.2 En el error de medición está involucrado el efecto de dos componentes, el error aleatorio y el error sistemático; los cuales están relacionados tal y como indica la siguiente figura:

**Figura 1<sup>5</sup>**- Relación entre los distintos tipos de error y los correspondientes conceptos cualitativos



<sup>5</sup>Adaptado de la "Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico", por CENAM / EMA, marzo 2008

**2.3** La precisión usualmente se especifica en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa.

**2.4** La precisión del método obtenida por el laboratorio debe ser menor o igual a la precisión del método que proporciona el fabricante; en caso que sea mayor, el laboratorio debe presentar una justificación estadística documentada de que no existe una diferencia significativa.

**2.5** Para laboratorios clínicos:  
(Según criterios del Clinical Laboratory Improvement Amendments - **CLIA**)

- Los resultados de la corrida intraserial o en intradía tienen menos precisión que la interserial, por lo que el criterio de aceptabilidad debe ser diferente.
- Para la precisión intraserial, la desviación estándar obtenida debe ser menor a  $\frac{1}{4}$  del error máximo permitido, es decir:

$$\text{D.E. intraserial} \leq 0,25 \text{ del EMP}$$

- Para la precisión interserial, la desviación estándar debe ser  $\frac{1}{3}$  o menos del error total permitido, es decir

$$\text{D.E. interserial} \leq 0.33 \text{ EMP}$$

- Una mayor desviación estándar implica un mayor coeficiente de variación y por lo tanto una menor precisión del método analítico.

### **3 Veracidad**

**3.1** La veracidad se relaciona con la presencia de errores sistemáticos, llamados también sesgo o desviación. La veracidad de un método se puede determinar mediante la comparación del valor de referencia certificados con los resultados obtenidos por el método de medición.

**3.2** Normalmente la veracidad se expresa en términos de sesgo; por ejemplo, en un análisis químico el sesgo se puede expresar si el método falla en extraer a todo el elemento de interés o si la presencia de un elemento interfiere en la determinación de otro.

***Nota:** La veracidad también es referida como la exactitud de la medición, pero no se recomienda el uso de este término.*

**3.3** Para verificar la veracidad de un método se pueden utilizar las siguientes herramientas:

- **Valoración de un material de referencia certificado**  
Donde el criterio de aceptabilidad es que el valor del error relativo sea menor o igual al reportado por el fabricante del equipo o al reportado por el método. Entre menor sea el porcentaje de error relativo mayor será la veracidad del método.

- **Estudios colaborativos**

Este estudio es útil cuando el laboratorio quiere demostrar que el método cumple con lo declarado por el fabricante.

- **Estudios de comparación interlaboratorios con base en los resultados de programas de ensayos de aptitud.**

- Para procedimientos analíticos que han sido implantados con un tiempo considerable de antelación por el laboratorio, procedimientos históricos dentro del laboratorio, es preferible utilizar esta herramienta que la comparación de métodos.
- El estudio debe tener resultados satisfactorios en relación con los requisitos estadísticos establecidos.
- Es requisito indispensable que el analito a acreditar se pruebe en, por lo menos, dos de los tres niveles de concentración (baja, media y alta) del intervalo de medición del método. Lo más conveniente es probar con tres niveles de concentración. Así mismo, para laboratorios clínicos sería óptimo contar con valores de veracidad correspondientes a niveles de decisión clínica.

**3.4** Si el método es nuevo y se va a implementar en el laboratorio clínico entonces se sugiere aplicar el procedimiento de la guía CLSI documento EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples.

***Nota:** Un tipo de programa de ensayos de aptitud mediante comparaciones interlaboratorios son comúnmente conocidos en el área clínica como Programas de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC).*

**B. Traducción del “Anexo D – Notas sobre ensayos cualitativos” de la Guía Eurachem “Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014)”.**

Los ensayos cualitativos siguen los principios básicos de los ensayos cuantitativos pero se necesitan aplicar conceptos únicos para describir las propiedades del método y para la interpretación de los resultados. Este apéndice hace una breve introducción a los ensayos cualitativos y señala lineamientos relevantes.

Los Análisis cualitativos son definidos por la IUPAC como: análisis en los que sustancias son identificadas o clasificadas en base a sus propiedades químicas o físicas, tales como reactividad química, solubilidad, peso molecular, punto de fusión, propiedades radioactivas (emisión, absorción), espectro de masa, vida media nuclear, etc. Esto significa que los resultados son expresados en una escala nominal, lo que es inferior a expresar los resultados en una escala de proporción. Por lo tanto, se recomienda el uso de análisis cualitativos, no cuantitativos, principalmente para efectos de detección o selección usando métodos de bajo costo o a concentraciones de analito cerca del límite de detección (LOD).

Un “ensayo cualitativo” da efectivamente una respuesta de “Si/No” a una concentración de corte para determinado analito. La validación involucra la identificación de dicha concentración de corte para clasificar/diagnosticar una condición; ej. para la presencia o ausencia de un agente contaminante en agua cuando existe una directiva, ley, etc. definir que concentración de corte aplicaría.

A manera de caracterizar las propiedades de un método cualitativo, un método cuantitativo con propiedades metrológicas superiores (método de confirmación), ej. el límite de detección inferior (LOD) es óptimo para determinar el verdadero estatus de presencia o ausencia de una condición. Las propiedades de un método cualitativo deberían ser determinadas a cierto número de concentraciones, inferiores y superiores a la concentración de corte. El uso de un método cuantitativo de confirmación es preferible al uso de blancos adicionados y no adicionados.

Para métodos cualitativos, la precisión no puede ser expresada como la desviación estándar o la desviación estándar relativa, pero puede ser expresada como la tasa de verdaderos y falsos positivos, y la tasa de verdaderos y falsos negativos; esto se ilustra en la siguiente figura 1.

	Muestras superiores al punto de corte	Muestras inferiores al punto de corte	
Ensayo Positivo	Verdaderos Positivos	Falsos Positivos (Error Tipo I)	Número total de ensayos positivos Número total de ensayos negativos
Ensayo Negativo	Falsos Negativos (Error Tipo II)	Verdaderos Negativos	
	Número total de muestras superiores al punto de corte	Número total de muestras inferiores al punto de corte	

**Figura 1 – tabla 2x2 que sirve como base para el cálculo de tasas de falsos positivos y falsos negativos**

La “sensibilidad de diagnóstico” es la proporción de muestras con presencia de la condición, es decir, con una concentración superior a punto de corte, que obtuvieron resultados positivos en el ensayo cualitativo. La sensibilidad de diagnóstico es una característica fundamental de un método cualitativo, ya que expresa la habilidad de detectar pequeñas cantidades del analito en una muestra para producir la respuesta binaria de “si/no” a un nivel predefinido de probabilidad.

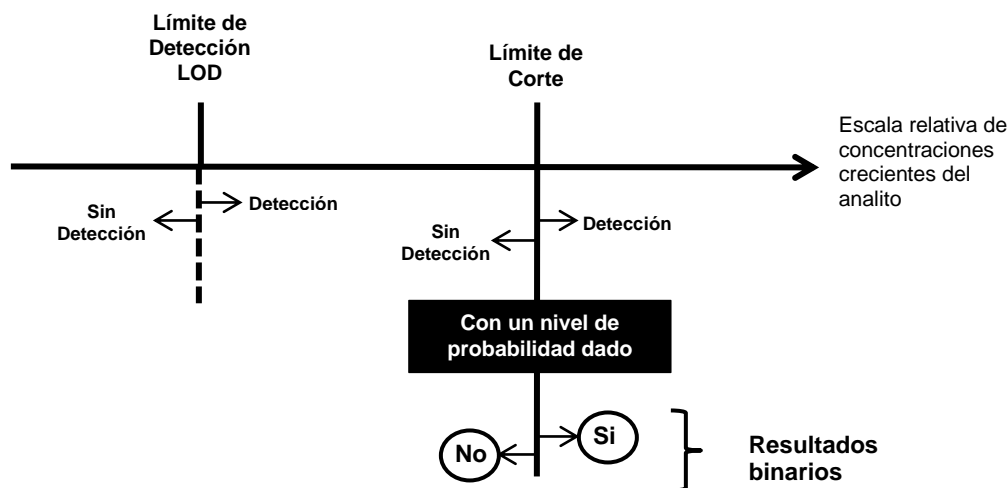
$$\text{Sensibilidad de Diagnóstico} = \frac{\text{número de muestras verdaderas positivas}}{\text{número total de muestras con presencia de la condición}}$$

La “especificidad de diagnóstico” es la proporción de muestras sin presencia de la condición, es decir, con una concentración inferior a la concentración de corte, que obtuvieron resultados negativos en el ensayo cualitativo.

$$\text{Sensibilidad de diagnóstico} = \frac{\text{número de muestras verdaderas negativas}}{\text{número total de muestras sin presencia de la condición}}$$

Los datos obtenidos a partir de la comparación contra un método de confirmación deberían ser utilizados si están disponibles; de no ser así, se pueden utilizar los resultados del análisis de muestras en blanco adicionadas y no adicionadas.

Los parámetros importantes para la medición de la calidad en ensayos cualitativos son el Límite de Detección (LOD) y el límite de corte (figura 2). El LOD es definido de forma similar que en un ensayo cuantitativo; la concentración de un analito que proporciona una señal que puede ser distinguida estadísticamente de la señal media de muestras en blanco relevantes. El límite de corte, si se determina correctamente, es donde las tasas de falsos negativos para concentraciones superiores al límite son bajas – con una probabilidad declarada. En la validación se evalúa el límite de corte propuesto.



**Figura 2** – Existen dos referencias cuantitativas que producen la respuesta binaria en la clasificación/cualificación del tipo de muestra del ensayo cualitativo: 1. el límite de detección (LOD) el cual es inherente al método, 2. el límite de corte que es dado en el procedimiento documentado. Ambos se colocan en una escala imaginaria de concentraciones crecientes. En la zona de detección, sobre el límite de detección, el límite de corte permite distinguir las zonas de concentraciones del componente donde se produce la respuesta binaria correcta, es decir, “no” bajo los límites y “sí” sobre ellos.

Varios conceptos adicionales son utilizados en los análisis cualitativos (tabla 1). Los valores predictivos de los resultados se pueden incrementar al aumentar la prevalencia de las concentraciones superiores al límite de corte en las muestras analizadas por el ensayo cualitativo; por ejemplo, por otras fuentes de información además que el método químico

cualitativo. Esto mejorará substancialmente el valor práctico de la medición del método cualitativo.

La selectividad de un método cualitativo es un concepto ordinal: la medida en la que otros analitos además del incluido en la especificación interfieren con el análisis. Esta característica fundamental del método puede ser definida también como su habilidad para producir resultados que no son influenciados por efectos de la matriz. Entre mejor es la selectividad, mayor es la certeza de la identidad y clasificación de la muestra.

Concepto (símbolo)	Descripción	Formula
Tasa de probabilidad positiva (LR+)	La proporción de la tasa de verdaderos positivos contra la tasa de falsos positivos	$LR+ = \frac{\text{sensibilidad de diagnóstico}}{1 - \text{especificidad de diagnóstico}}$
Tasa de probabilidad negativa (LR-)	La proporción de la tasa de verdaderos negativos contra la tasa de falsos negativos	$LR- = \frac{1 - \text{sensibilidad de diagnóstico}}{\text{especificidad de diagnóstico}}$
Tasa de diagnóstico impar (DOR)	Esto combina los conceptos de sensibilidad diagnóstica, especificidad diagnóstica y las tasas de probabilidad en un solo número.	$DOR = \frac{LR+}{LR-}$
Valor predictivo positivo (PPV)	La proporción de las muestras con un resultado positivo del ensayo cualitativo que poseen la condición. Se toma en cuenta la prevalencia de la condición en las muestras de la población meta.	$PPV = \frac{\text{número de verdaderos positivos}}{\text{número total de positivos}}$
Valor predictivo negativo (NPV)	La proporción de las muestras con un resultado negativo del ensayo cualitativo que no poseen la condición. Se toma en cuenta la prevalencia de la condición en las muestras de la población meta.	$NPV = \frac{\text{número de verdaderos negativos}}{\text{número total de negativos}}$
<b>Tabla 1 – Definición y cálculo de conceptos que describen las propiedades de diagnóstico de métodos de medición, incluyendo métodos de medición cualitativos.</b>		

### 13. IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS

Fecha	Descripción del cambio	Versión		Solicitante
		Anterior	Actual	
28.01.19	- Cambio de encabezado	V01	V02	Gestoría de calidad