Elaborado o modificado por:	**Visto Bueno Gestión de Calidad:**
Comisión de Calidad **Departamento de Ciencias Forenses**	**Máster Daniel Gómez Murillo** **Asegurador de Calidad , UGC**
Aprobado por: **M.B.A. Mauricio Chacón Hernández** **Jefe, Departamento de Ciencias Forenses**	

COPIA NO CONTROLADA

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	01/07/2011	01/05/2014	Versión Inicial del Procedimiento	---	MSZ
02	01/05/2014	01/08/2016	Ver versión número 02	---	MSZ
03	01/08/2016	31/05/2017	Modificación de formato. Modificación de los puntos para la validación de análisis interpretativos, cualitativos y ADN	06-16	MCH
04	31/05/2017	22/06/2018	Incluye cambios en validación de identificación por ADN e indicaciones para verificación de hojas de cálculo	14-17	MCH
05	22/06/2018	08/04/2019	Modificación y agregado de texto para incluir aspectos AR 3037 de la norma ISO/IEC 17020:2012 del Organismo Acreditador. Además se modifica como acción correctiva producto de auditoría interna del año 2018.	16-18	MCH
06	08/04/2019	24/07/2019	Se incluyen aspectos de la Norma ISO/IEC 17025:2017 y del AR 3125 de la Norma ISO/IEC 17025:2017 del Organismo Acreditador	12-19	MCH

07	24/07/2019	14/07/2020	Modificación y agregado de texto para incluir aspectos de observaciones recibidas, de la Auditoría Interna del Año 2019 y de la nueva emisión del documento AR 3125 de ANAB (2019/04/29)	24-19	MCH
08	14/07/2020	03/08/2021	Se incluye referencia a las nuevas emisiones del documento AR 3120 de ANAB (2019/07/03 y 2020/06/15) y aspectos de observaciones recibidas.	14-20	MCH
09	03/08/2021	05/07/2022	Se incluyen cambios producto de la revisión periódica, de la Auditoría Interna del año 2021, de la Auditoría Amistosa, del Sistema de Gestión de Calidad del proyecto International Narcotics and Law Enforcement Oficce/Universidad de West Virginia y de la adopción de Estándares de OSAC	22-21	MCH
10	05/07/2022	31/07/2023	Se incluyen cambios producto de la revisión periódica del Sistema de Gestión de Calidad. Se incluyen aspectos de revisión del plan e informe de validación. Versión revisada en reunión de Comisión de Calidad 08-2022.	19-22	MCH
11	31/07/2023	28/02/2025	Se incluyen cambios producto de la revisión periódica del Sistema de Gestión de Calidad, de la Auditoría Interna y de los cambios en los documentos AR 3125 y AR 3120 de ANAB.	15-23	MCH
12	28/02/2025		Se incluyen cambios producto de la revisión periódica del Sistema de Gestión de Calidad y de la implementación de estándares de OSAC en la Sección de Genética Forense.	08-25	MCH

COPIA NO CONTROLADA

ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

COPIA NO CONTROLADA

1 Objetivo:

El objetivo del presente procedimiento es establecer de forma sistemática los diseños experimentales a seguir para la validación o verificación del desempeño de los métodos de análisis empleados en cada una de las Secciones del DCF.

2 Alcance:

Este procedimiento aplica a cada uno de los métodos de análisis establecidos dentro del DCF y que deben ser validados o verificados con fin de asegurar la consistencia y confiabilidad en los resultados, y no comprende las metodologías de trabajo cuyos resultados se basan en la medida directa de una cantidad física.

Todo método de análisis deberá ser verificado cuando se encuentra en alguna de las siguientes categorías:

- Método reconocido o establecido como un método de referencia por un ente Nacional o Internacionalmente
- Método validado por algún otro laboratorio.
- Método por kit comercial.

Todo método de análisis deberá ser validado cuando se encuentra en alguna de las siguientes categorías (ver cuadro II):

- Método desarrollado por el DCF.
- Método de otro origen (no normado).
- Cuando se realizan modificaciones de un método analítico establecido para mejorar el rendimiento o extender su uso más allá de aquello para lo que fue validado originalmente.
- Para demostrar la equivalencia entre un método/instrumento establecido y un método/instrumento nuevo.

Todo método de análisis validado deberá ser revalidado cuando se le realice alguna modificación en la metodología y por criterio, experiencia y conocimiento del método del personal responsable, se considere necesario realizarlo. Para efecto de la selección de los parámetros para esta revalidación remítase al Anexo 01, en el cual se observan ejemplos de algunos de estos cambios y los parámetros a revalidar.

COPIA NO CONTROLADA

La versión No 6 de este procedimiento incluye algunos cambios detallados en la portada del mismo. La modificación fue realizada por una Comisión conformada por funcionarios de este Departamento pertenecientes a las diversas secciones, convocada para estos efectos por la Jefatura Departamental (M.B.A. Mauricio Chacón Hernández). Dicha Comisión estuvo integrada por: Licda. Gina Bagnarello Madrigal (coordinadora), Lic. Ronald Castro Esquivel, Máster Harley Chacón Núñez, Dr. Alejandro Hernández Bolaños, Dr. Marco Martínez Esquivel, Lic. Roberto Morales Montero, Máster César Pérez Alfaro, Lic. Luis Diego Ureña Mora, M.Sc. Steven Vargas Ramírez y el Máster Daniel Gerardo Gómez Murillo.

La versión No 8 no incluye cambios de fondo, por lo que el cambio se realiza y aprueba a nivel de Comisión de Calidad.

La versión No 9 no incluye cambios de fondo, por lo que el cambio se realiza y aprueba a nivel de Comisión de Calidad.

La versión No 10 no incluye cambios de fondo, por lo que el cambio se realiza y aprueba a nivel de Comisión de Calidad.

La versión No 11 no incluye cambios de fondo, por lo que el cambio se realiza y aprueba a nivel de Comisión de Calidad.

La versión No 12 incluye cambios relacionados con la Sección de Genética Forense y se observaciones recibidas, por lo que el cambio se realiza y aprueba a nivel de Comisión de Calidad.

COPIA NO CONTROLADA

3 Referencias:

- ANAB AR 3125, ISO/IEC 17025:2017, Laboratorios de Ciencias Forenses de Ensayo y Calibración. Requisitos de Acreditación. 2023/02/01.
- ANAB AR 3120, ISO/IEC 17020:2012, Laboratorios de Ciencias Forenses de Ensayo y Calibración. Requisitos de Acreditación. 2023/02/01.
- ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology.
- Butler, John. Debunking some urban legends surrounding validation within the Forensic Community. Profiles in DNA. 2006.
- Conceptos De Validación De Metodologías Analíticas, Fascículo N° 1: Clasificación de metodologías analíticas y sus requerimientos validables mínimos. Compilado por Lic. Rónald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.
- Conceptos De Validación De Metodologías Analíticas, Fascículo N° 2: Diferentes fases en la investigación y desarrollo de metodologías analíticas. Compilado por Lic. Rónald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.
- Conceptos De Validación De Metodologías Analíticas, Fascículo N° 3: Parámetros de desempeño de las metodologías analíticas: Selectividad y Especificidad. Compilado por Lic. Rónald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.

- Conceptos De Validación De Metodologías Analíticas, Fascículo N° 4: Parámetros de Desempeño de las Metodologías Analíticas: Linealidad e Intervalo de linealidad. Compilado por Lic. Rónald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.

- Conceptos De Validación De Metodologías Analíticas, Fascículo N° 5: Parámetros de Desempeño de las Metodologías Analíticas: Exactitud y Precisión. Compilado por M.Sc. Steven Vargas, Licda. Lucrecia Montero, Dr. Marco Martínez, Lic. Ronald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.

- Conceptos De Validación De Metodologías Analíticas, Fascículo N° 6: Parámetros de Desempeño de las Metodologías Analíticas: Límite de Detección (LD) y límite De Cuantificación (Lq). Compilado por M.Sc. Steven Vargas, Licda. Lucrecia Montero, Dr. Marco Martínez, Lic. Rónald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.

- Conceptos De Validación De Metodologías Analíticas, Fascículo N° 7: Robustez y Rugosidad. Compilado por M.Sc. Steven Vargas, Licda. Lucrecia Montero, Dr. Marco Martínez, Lic. Rónald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.

- Conceptos De Validación De Metodologías Analíticas, Fascículo N° 8: Parámetros de Desempeño de las Metodologías Analíticas: Sensibilidad. Compilado por M.Sc. Steven Vargas, Licda. Lucrecia Montero, Dr. Marco Martínez, Lic. Rónald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.

- Conceptos de Validación de Metodologías Analíticas, Fascículo N° 9: Corredor de errores en ajustes de calibración lineales. Compilado por M.Sc. Steven Vargas, Licda. Lucrecia Montero, Dr. Marco Martínez, Lic. Rónald Castro Esquivel, Departamento de Ciencias Forenses, O.I.J., 2002.

- Correa, J.C.; Iral, R; Rojas, L. Estudio de potencia de pruebas de homogeneidad de varianza. Revista Colombiana de Estadística 2006, 29, 57-76.

- ECA MC-PO01-G01. Guía de Validación de Métodos. Ente Costarricense de Acreditación, 2010, 9 páginas.

- ECA-MC-PO01 Política de Validación de Métodos. Ente Costarricense de Acreditación, 2010, 15 páginas.

- Franquesa Garner, R. Estabilidad de Medicamentos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Imprenta Planas, España, 1985.

- ICH-FDA Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1996, 11 páginas.

- Kan ji. Gopal K. 100 statistical Tests. London SAGE Publication Litd., 1993.

- Miller, J.N. and Miller, J.C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4a edición. Prentice Hall: Madrid, 2002, traducido de la 4a edición en inglés del 2000.

- Norma ISO/IEC 17025:2017 Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

COPIA NO CONTROLADA

- Organismo Argentino de Acreditación: "Guía para la Validación de Métodos de Ensayo", Junio 2008. pp.8.
- Pérez Cuadrado, J.A.; Pujol Forn, M. (Coordinadores). Validación de Métodos Analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria: 2001; 331.
- Promega Corporation. International Validation of STR Systems. Reference Manual. 16 pag. 2006.
- QCC-VAL-002-D1 "Validación e implementación de métodos" de la ENFSI.
- Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDAM). Revised Validation Guidelines. Profiles in DNA 6(3). 2004.
- Wernimont, G.T. Use of statistics for develop and evaluate analytical methods. 5th edition. AOAC Internacional, Gaithersburg MD: 1996.
- Gill P et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. Forensic Science International 160: 90-101, 2006.
- Crespillo, M. et al. Criterios mínimos recomendados para la HEPMIX, 1ª de. Junio 2012, mimeografiado, 25 p.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Drogas y el Delito, Naciones Unidas, Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos, ST/NAR/41, Nueva York: 2010.
- Green, R.L., Roinestad, I.C., Boland, C., Hennessy, L.K. Developmental Validation of the Quantilifiler Real Time PCR Kits for the Quantification of Human Nuclear DNA Samples, J. Forensic Sci, Vol 50, No 4. July 2005
- Butts, ELR, NIST Validation Studies on the 3500 Genetic Analyzer, 2011.
- Comunicación personal con el Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses, Barcelona España
- Shrivastava, A.; Gupta, V.P. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods Chronicles of Young Scientists 2011, 2, 21-25. En: http://www.cysonline.org/temp/ChronYoungSci2121-4100629_112326.pdf
- The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). En: http://www.iupac.org/publications/pac/2006/pdf/7801x0145.pdf
- Standard Test Procedure Manual 304-3 Interlaboratory Testing Programs - Saskatchewan Department, En: http://www.highways.gov.sk.ca/304-3/

COPIA NO CONTROLADA

- Moffat, A.C. *et al.* Clarke`s Analysis of Drugs and Poisons. 4Th Ed. Volume 1. Pharmaceutical Press: London, 2011. Method Development and Validation Chapter 20. pp. 334-349.

- Bell, S., A Beginner`s Guide to Uncertainty of Measurement, Issue 2, National Physical Laboratory, United Kingdom: 1999.

4 Equipos y Materiales:

- Computadora
- Ampo Registro de Validación de Métodos de Análisis Forenses
- Base de datos de registro de información de funcionarios
- Formulario Informe de Validación
- Formulario Plan de Validación
- Gene Mapper IDX o superior
- Hoja de cálculo Validación de Métodos de Análisis Forenses: elaborada por el Dr. Marco Martínez Esquivel
- Minitab® 17.1.0
- Pruebas de competencia según la metodología en particular

COPIA NO CONTROLADA

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Los requeridos de acuerdo a lo indicado en el Formulario de validación de la metodología a validar (por ejemplo materiales de referencia certificados, patrones, etc.).

6 Condiciones Ambientales:

N/A

7 Procedimiento:

Es requisito para la aplicación de este PON, que los equipos que se consideran críticos para el desarrollo de una determinada metodología deben estar calibrados antes de su uso.

Utilice una calculadora, una hoja de cálculo, el software de procesamiento de datos del equipo o un software estadístico para realizar el cálculo de los parámetros de validación. También está permitido el uso de software estadístico como Minitab para realizar dicho cálculo.

En el caso de las hojas de cálculo personalizadas deben ser verificadas manualmente, contra software estadístico o las hojas indicadas en el punto 4. En este caso cada Sección debe conservar el respectivo registro de estas verificaciones con el detalle de lo realizado.

La validación de un procedimiento se realiza de acuerdo con el procedimiento de operación normado y el plan de validación. Los resultados de la validación y por lo tanto, los criterios de aceptación y rechazo establecidos a partir de esta, se deben tomar en cuenta para definir en los procedimientos de operación normados específicos el análisis y la interpretación de los datos para reportar resultados, interpretaciones u opiniones o declaraciones de conformidad según corresponda, así como para indicar las limitaciones del método.

COPIA NO CONTROLADA

7.1 Parámetros de validación a considerar para cada tipo de análisis:

- Clasifique, para efecto de aplicación de este PON, el método de análisis a validar en uno de los tipos que se indican en el Cuadro I.

Cuadro I: Clasificación de métodos de análisis para la aplicación del proceso de validación.

Tipo de Métodos de Análisis	
A. Cuantitativos: métodos en los que se determina la cantidad de analito en una muestra.	
B.Cualitativos:	B1. Identificación química y Clasificación
	B2. Interpretativos
	B3. Identificación por ADN

- Establezca, de acuerdo al tipo de análisis, los parámetros de validación y/o verificación recomendados como mínimos para la validación que se indican en el Cuadro II.

Tipo de método de análisis	Parámetros de validación	
	Validación	Verificación
A.1 Cuantitativos (7.2)	Linealidad (7.2.1) Límite de detección (7.2.2) Límite de cuantificación (7.2.3) Veracidad (7.2.4) Recuperación (cuando aplica; 7.2.5) Precisión (repetibilidad y reproducibilidad y/o precisión intermedia; 7.2.6) Especificidad y selectividad (7.2.7) Robustez (cuando aplica; 7.2.8)	Límite de detección si la matriz difiere del método de referencia (7.2.2) Veracidad (7.2.4) Precisión (7.2.6) Especificidad y selectividad si la matriz difiere del método de referencia (7.2.7)
A.2 Pruebas de umbral	Recuperación (cuando aplica; 7.3.3 Precisión a nivel de umbral (7.2.6) Especificidad y selectividad (7.3.4)	Recuperación (cuando aplica; 7.3.3 Precisión a nivel de umbral (7.2.6)
B1. Identificación química y Clasificación (7.3)	Límite de detección (7.3.1) Recuperación (cuando aplica; 7.3.3) Precisión (7.3.2) Exactitud (grado de certeza) y Reproducibilidad (7.3.5) Especificidad y selectividad (7.3.4) Robustez (cuando aplica; 7.3.6)	Límite de detección (Cuando aplica; 7.3.1) Recuperación (cuando aplica; 7.3.3) Precisión (7.3.2) Especificidad y selectividad si la matriz difiere de la indicada en el método de referencia (7.3.4)
B2. Interpretativos (7.4)	Veracidad (grado de certeza) (7.4) Precisión intermedia (7.4) Reproducibilidad (7.4)	

Tipo de método de análisis	Parámetros de validación
	Validación
3. Identificación por ADN (7.5)	Extracción de ADN (7.5.2) Verificación
	Cuantificación de ADN (7.5.1) Linealidad Varianza
	Amplificación de ADN (7.5.4) Umbral Estocástico Linealidad (límite de detección)
	Analizador genético (7.5.3) Linealidad Varianza inyección capilar

COPIA NO CONTROLADA

- Establezca los criterios de aceptación y rechazo para cada uno de los parámetros de la metodología a validar, de acuerdo a la legislación, normativa, recomendaciones y/o experiencia del perito, contando con el aval de la Jefatura de Sección.

- Complete el formulario Plan de Validación.

- Solicite la revisión de dicho plan al líder técnico o a otro funcionario(a) competente de acuerdo con lo indicado por la Jefatura de Sección. De esto se deja constancia en el respectivo formulario.

- Remita a revisión y aprobación de la Jefatura de Sección una vez revisado el plan de validación

- Proceda, una vez recibida la aprobación por parte de la Jefatura de Sección con la validación de la metodología según se indica a partir de 7.2, 7.3, 7.4 ó 7.5 de este procedimiento según corresponda.

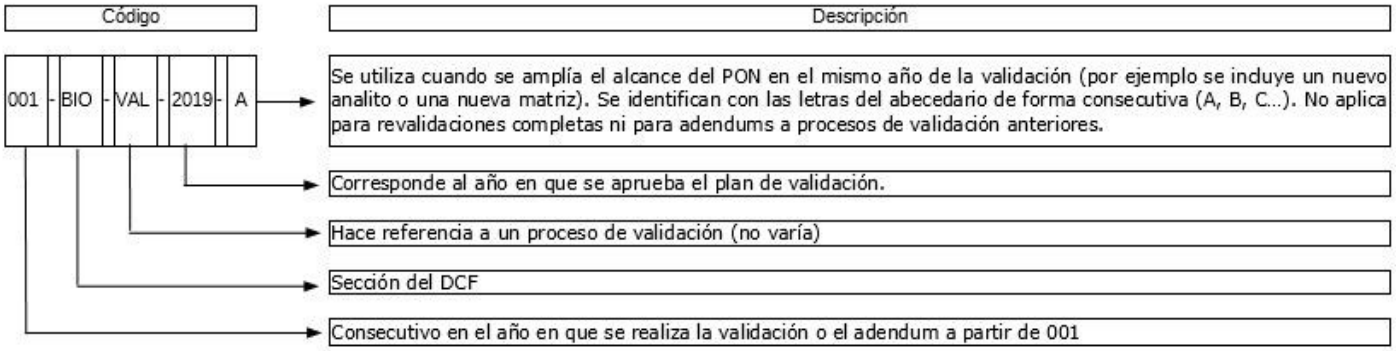
Nota No 1: Al elaborar planes e informes de validación se debe considerar la necesidad de evaluar el efecto de las condiciones ambientales. Lo anterior en el caso de metodologías en las que se haya identificado una influencia potencial ya sea a través de la experiencia, documentación técnica o en bibliografía.

- Mantenga para cada proceso validación una carpeta electrónica (siga lo indicado en el procedimiento Control de Registros) con el Formulario Informe de Validación, el Formulario Plan de Validación, Hojas de Cálculo, espectros, electroferogramas, cromatogramas, etc.

Nota No 2: Para el caso de validaciones/verificaciones realizadas por una parte externa al DCF en las condiciones reales del laboratorio en específico, no se requiere la utilización de los formularios Plan de validación e Informe de Validación. Sin embargo, se debe verificar que los parámetros a evaluar sean al menos los indicados en este procedimiento y se debe contar con toda la documentación que respalde dicha validación/verificación, así como con la aprobación de los resultados.

- Identifique los registros digitales como el Formulario Informe de Validación, el Formulario Plan de Validación y Hojas de Cálculo. Además de lo anterior se puede agregar una indicación de la naturaleza de los documentos. Lo mismo aplica para la carpeta indicada en el punto anterior:

COPIA NO CONTROLADA



En el caso de registros digitales como espectros, electroferogramas, cromatogramas, etc., no es necesario identificar cada uno de ellos con el código anterior. Estos documentos se archivan en una carpeta identificada con el consecutivo completo y el nombre de los documentos que contiene (Ej: 001-BIO-VAL-2018 cromatogramas). En el caso de otros registros digitales se puede utilizar alguna aplicación que de trazabilidad al documento como HashMyFiles. En el caso de registros físicos para aspectos de identificación de la validación, identifíquelos al menos con el consecutivo y el año. Si se requiere realizar un adendum a un proceso de validación anterior, se debe asignar a este adendum un código nuevo correspondiente al año en curso, pero indicando en el alcance el consecutivo correspondiente al año de la validación original.

COPIA NO CONTROLADA

7.2 Validación de Métodos de Análisis Cuantitativos:

Nota No 3: Por las particularidades de una metodología puede requerirse utilizar una forma diferente para la estimación de un parámetro determinado, acorde con lo que sea aceptado para la evaluación del desempeño por la Comunidad Científica. Como por ejemplo lo estipulado en el documento: "ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. " que aplica en el área de Toxicología Forense o al documento o "Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) Recommendations. Versión 7.0; Part IV B Quality Assurance / Validation of Analytical Methods, 2014; pp. 43–48.", este último se contempla en la norma E2549 de ASTM y que aplica en el análisis de drogas de decomiso. Las referencias, el procedimiento y las herramientas estadísticas utilizadas deberán describirse y anexarse al plan e informe de validación respectivo.

En caso de que no se pueda seguir lo indicado en este procedimiento se debe dejar documentado de manera explícita y detallada el motivo de lo anterior (indicando de ser posible referencias bibliográficas) y la forma en que se procedió a determinar un parámetro de validación, lo anterior por medio del plan y el informe de validación.

7.2.1 Evaluación de linealidad:

7.2.1.1 Establezca el intervalo de trabajo para realizar la evaluación de la linealidad, basado en la literatura, experiencia del laboratorio, requerimientos de análisis o en los instrumentos analíticos disponibles.

7.2.1.2 Prepare, dentro del intervalo establecido anteriormente, al menos cinco niveles de calibración (con o sin matriz dependiendo de las características de la metodología). Estos niveles deben incluir los límites de decisión o valores máximos permitidos (según las normas y legislaciones, nacionales o internacionales). El nivel máximo para la determinación de linealidad dependerá de la metodología de análisis en particular. Una preparación adicional corresponderá a una disolución sin analito.

7.2.1.3 Prepare los calibradores o patrones definidos en el punto anterior de acuerdo con cada metodología particular. La preparación de los calibradores debe realizarse preferiblemente de forma independiente (una disolución madre para cada calibrador) para minimizar el arrastre de posibles errores sistemáticos derivados de la preparación de las disoluciones estándar.

7.2.1.4 Realice las mediciones instrumentales directas de los calibradores en sentido creciente de la concentración para minimizar posibles efectos de memoria en el equipo. Este procedimiento debe repetirse por lo menos 5 veces para cada nivel de concentración (repeticiones).

Nota No 4: Al realizar los experimentos sobre un amplio intervalo, se podrá establecer el ámbito de aplicabilidad de un instrumento analítico. Este ámbito inevitablemente está subordinado a la dispersión natural o aleatoria de las respuestas del instrumento (estimación de repetibilidad del instrumento), y por lo tanto es necesario utilizar una misma disolución para cada concentración, pues en el caso de utilizar la lectura sobre disoluciones independientes (las cuales incluirían la dispersión de preparación del analista), se introduce una dispersión mayor que no es propia del instrumento, restando potencia estadística a la estimación de linealidad del instrumento.

Al final tendrá un total de 25 determinaciones como mínimo, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del sistema. Lo anterior para asegurar suficientes grados de libertad en las pruebas de significancia que se realizaran posteriormente.

7.2.1.5 Obtenga la curva de calibración con los puntos generados a partir de las lecturas realizadas. Para esto y los pasos subsiguientes utilice una calculadora, una hoja de cálculo, el software de procesamiento de datos del equipo o un software estadístico.

7.2.1.6 Realice un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados simples o no ponderados y obtenga la relación expresada como una recta de tipo:

$$y = m\,x + b$$

Donde: *"y"* corresponde a la respuesta instrumental, *"m"* corresponde a la pendiente y es una medida de la sensibilidad de calibración y se expresa en unidades de respuesta sobre unidades de concentración o cantidad del analito, *"x"* corresponde a la concentración y *"b"* es el intercepto.

7.2.1.7 Obtenga el coeficiente de regresión lineal (r) y el coeficiente de determinación (r^2).

7.2.1.8 Obtenga el gráfico de la distribución aleatoria de los residuales mediante un histograma y compruebe que existe una distribución normal. Se comprueba que los datos provienen de una distribución normal cuando:

COPIA NO CONTROLADA

Los residuales están distribuidos de forma simétrica en torno a la media, con las medidas agrupadas hacia el centro y sin tendencias.

En la representación del porcentaje de frecuencia acumulada en función de los residuales de la curva, los puntos (la mayoría) se sitúan sobre una línea recta.

En caso de que la distribución no sea normal se sale del alcance de este PON y se debería de recurrir a un análisis por estadística no paramétrica.

7.2.1.9 Evalué la linealidad. Se confirma linealidad, si se cumplen los siguientes criterios:

El coeficiente de correlación al cuadrado debe ser superior a 0,995; o bien considere lo que indique la norma específica para cada área de trabajo.

El análisis de linealidad también se puede realizar por el análisis F de ANOVA. Para esto último obtenga la sumatoria de residuales al cuadrado y la sumatoria de cuadrados totales de la regresión. Reste a la sumatoria de cuadrados totales la sumatoria de residuales al cuadrado y obtenga la sumatoria de cuadrados de la regresión. Con esta última, como numerador y con los residuales cuadrados como denominador realice una prueba F. El F crítico se estima para 1 grado de libertad en el numerador y el número total de determinaciones menos 2 para el denominador, al 95% de confianza.

Si no se comprueba la linealidad, por el criterio seleccionado para la metodología modifique el ámbito de linealidad para abarcar un ámbito más estrecho, donde no se observen gráficamente desviaciones. Repita el procedimiento descrito en el punto anterior para evaluar la linealidad. En todo momento se deberá disponer de al menos cinco niveles de calibración.

7.2.1.10 Obtenga la varianza de la respuesta analítica para cada nivel de concentración y aplique la prueba estadística de Cochran (G) (ver Anexo 03).

Nota No 5: Si se demuestra la condición de homocedasticidad, la calibración deberá realizarse considerando mínimos cuadrados simples, caso contrario, se utilizará mínimos cuadrados ponderados. En caso que se demuestre que no existe diferencia significativa de los resultados obtenidos mediante ambas formas de cálculo, se podrá utilizar el modelo más simple para los análisis de rutina de la metodología.

COPIA NO CONTROLADA

7.2.2 Evaluación del límite de detección de la metodología analítica:

Proceda como se indica en el punto 7.2.2.1., si el método que se está validando utiliza una curva de calibración; en caso contrario seleccione (de acuerdo con la experiencia del analista) entre alguna de las opciones que más se ajuste a la metodología particular y según se describe en 7.2.2.2, 7.2.2.3, 7.2.2.4, 7.2.2.5 ó 7.2.2.6.

Posterior a su estimación, el límite de detección debe ser comprobado experimentalmente como se indica en 7.2.2.8.

7.2.2.1 Estimación por Curva de Calibración:

7.2.2.1.1 Prepare una curva de calibración considerando lo siguiente:

- Si el método presenta linealidad en un orden de magnitud, prepare la curva de calibración abarcando el intervalo lineal o intervalo de trabajo (al menos cinco niveles). Para esto utilice los resultados de las mediciones obtenidas en 7.2.1.

- En caso de que la curva de calibración sea lineal en varios órdenes de magnitud, construya una curva de calibración incluyendo sólo concentraciones en el orden de magnitud más bajo (al menos cinco niveles), para lo anterior aplique lo indicado en el punto 7.2.1.

- Valore preliminarmente la respuesta instrumental para bajas concentraciones del analito a partir de datos derivados de la literatura, parámetros reportados por el fabricante del equipo utilizado o basado en experiencias previas realizadas en el laboratorio con el fin de estimar el ámbito donde posiblemente se encuentre el límite de detección.

7.2.2.1.2 Realice un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados y obtenga la relación expresada como una recta de tipo:

$$y = m\,x + b$$

Para esto y los pasos subsiguientes utilice una calculadora, una hoja de cálculo, el software de procesamiento de datos del equipo o un software estadístico.

7.2.2.1.3 Obtenga los valores de desviación estándar de la pendiente "s_m", de desviación estándar del intercepto "s_b" y desviación estándar de regresión $S_{y/x}$.

7.2.2.1.4 Estime el límite de detección empleando una de las siguientes opciones de acuerdo a su aplicabilidad al método de análisis específico.

COPIA NO CONTROLADA

7.2.2.2 Estimación por señal de ruido:

En el caso de las técnicas cromatográficas y microanálisis de rayos X, entre otras, dicha estimación puede realizarse por medio de la desviación del ruido en un intervalo de valoración o a partir de la relación entre la señal y la magnitud del ruido en un intervalo. Calcule el LD como 3 veces la señal del ruido "SR" (ver anexo 04).

7.2.2.3 Estimación por señal de blanco: (cuando se obtiene señal o respuesta analítica con el blanco)

Verifique mediante la lectura de al menos diez preparaciones de blanco, si con ellos obtiene alguna respuesta o señal analítica. En caso afirmativo, la estimación del límite de detección puede realizarse como 3 veces la desviación estándar de la señal del blanco "SB" entre la pendiente o con la siguiente ecuación cuando se quiere considerar la ponderación numérica del número de réplicas del número de blancos utilizados.

$$LD = \frac{3\ S_B}{m\ \sqrt{n}}$$

Donde *"m"* es el valor de la pendiente, *"S_B"* es la desviación estándar de la señal del blanco y *"n"* es el número de réplicas del blanco.

7.2.2.4 Método de la desviación estándar del blanco estimada como la desviación estándar de regresión o desviación de los errores aleatorios en la dirección "y" de la curva de calibración (SB = $s_{y/x}$):

Utilice los datos de pendiente "m" y desviación estándar de regresión de la curva ($S_{y/x}$) para estimar el límite de detección con la fórmula siguiente:

$$LD = 3\,S_{y/x}/m$$

Donde "m" es el valor de la pendiente y "$S_{y/x}$" es la desviación estándar de regresión o desviación de los errores aleatorios en la dirección "y" de la curva de calibración; utilizada en esta fórmula como estimación de la desviación estándar del blanco.

7.2.2.5 Método del corredor de errores

Obtenga, cuando el intercepto es positivo, el corredor de error superior (α = 0,05 ó 0,01) cuando la curva corta el eje Y (Xi=0). Con este valor del corredor de error superior, estime con la fórmula de la curva el límite de detección como el valor correspondiente a la concentración (ver Anexo 05).

7.2.2.6 Método de corredor de errores para intercepto negativo

Obtenga, cuando el intercepto es positivo, el corredor de error superior (α = 0,05 ó 0,01) cuando la curva corta el eje X (Yi=0). Con este valor del corredor de error superior, estime con la fórmula de la curva el límite de detección como el valor correspondiente a la concentración (ver Anexo 05).

7.2.2.7 Método de la desviación del intercepto

Obtenga, cuando el intercepto es positivo, el valor para la dispersión del intercepto (s_b). Con este valor multiplicado por 3 y el valor de la pendiente del ajuste, obtenga el LD con la siguiente fórmula (el límite de detección como el valor correspondiente a la concentración): (ver Anexo 05).

$$\mathbf{LD = 3\ s_b\ /\ m}$$

COPIA NO CONTROLADA

7.2.2.8 Comprobación experimental del LD:

Compruebe experimentalmente el LD preparando al menos por duplicado una disolución. Si no se observa señal analítica, continúe preparando disoluciones más concentradas hasta observar señal analítica con una razón señal / ruido mayor a 3 y reporte este resultado como el LD de la metodología.

Para las pruebas de color y TLC hacer la comprobación del límite de detección con 10 determinaciones y no debe obtenerse un falso negativo en más del 20% de las determinaciones.

7.2.3 Evaluación del límite de cuantificación de la metodología analítica:

Calcule el LC multiplicando por 10/3 el valor calculado como LD de acuerdo al método utilizado en 7.2.2.

$$LC = \frac{10}{3} LD$$

7.2.4 Evaluación de la veracidad

Seleccione entre las siguientes opciones para la evaluación de la veracidad, de acuerdo con la disponibilidad de materiales.

COPIA NO CONTROLADA

7.2.4.1 Método de MRC (se dispone de MRC en matriz):

7.2.4.1.1 Utilice MRC, de acuerdo a las posibilidades del laboratorio, idealmente en tres concentraciones, de ser posible diferentes de las preparadas para la curva de calibración e independientes, como se sugiere a continuación:

- Nivel bajo: idealmente la concentración que origina una respuesta igual a la del límite de cuantificación más dos desviaciones estándar del valor interpolado de concentración equivalente a dos desviaciones estándar de la señal del límite de cuantificación
- Nivel medio: valor central del ámbito de trabajo o valor de trabajo más frecuente.
- Nivel alto: idealmente límite superior del ámbito de trabajo menos el valor interpolado de concentración equivalente a dos desviaciones estándar de la señal del nivel más alto de la curva de calibración.

7.2.4.1.2 Evalúe la veracidad por medio del valor cuantificado del MRC con la curva de calibración instrumental. La veracidad se expresa con la fórmula del sesgo (expresado como porcentaje).

$$\text{Porcentaje de sesgo} = \frac{(\text{valor medido} - \text{valor certificado}) * 100}{\text{valor certificado}}$$

Nota No 6: La incertidumbre del MRC debe ser menor a la incertidumbre que se le pretende exigir al método. Si es un material de referencia tome la incertidumbre expandida (95%) indicada en el certificado.

Si no se cuenta con MRC para cada uno de los tres niveles de concentración y la metodología lo requiere evalúe la veracidad con el método de adiciones según se indica en 7.2.4.2.

7.2.4.2 Método de adiciones (no se dispone de MRC en matriz ni de estudios interlaboratoriales):

7.2.4.2.1 Prepare tres niveles de concentración, de ser posible diferentes de los preparados para la curva de calibración, cada nivel como mínimo por sextuplicado (preferiblemente a partir de una disolución madre diferente a la que se utilizó para preparar la curva de calibración) y por el método de adiciones (también conocido como fortificado o dopado), como se sugiere a continuación:

- Nivel bajo: idealmente la concentración que origina una respuesta igual a la del límite de cuantificación más dos desviaciones estándar del valor interpolado de concentración equivalente a dos desviaciones estándar de la señal del límite de cuantificación
- Nivel medio: valor central del ámbito de trabajo o valor de trabajo más frecuente.
- Nivel alto: idealmente límite superior del ámbito de trabajo menos el valor interpolado de concentración equivalente a dos desviaciones estándar de la señal del nivel más alto de la curva de calibración.

7.2.4.2.2 Cuantifique la concentración en la matriz fortificada con una curva de calibración instrumental. Esta es la misma curva de calibración instrumental que se utilizó en la estimación del parámetro de linealidad. De acuerdo a las características de la metodología puede ser mejor realizar la cuantificación con una curva de calibración en matriz (por ejemplo: curva de calibración de drogas en sangre para normalizar los efectos de matriz y tratamiento cuando sea necesario).

7.2.4.2.3 Calcule el sesgo (expresado como porcentaje) según:

$$\text{Porcentaje de sesgo} = \frac{(valor\ medido - valor\ fortificado) * 100}{valor\ fortificado}$$

Nota No 7: Con el diseño experimental que se propone a continuación, además de evaluar el sesgo, es posible determinar la presencia de errores constantes o proporcionales de la metodología. Esto por medio de ajustes lineales y análisis de los parámetros estadísticos de regresión.

7.2.4.2.4 Realice una regresión lineal, utilice los datos de valor medido como los valores del eje *"y"* y los datos de valor fortificado como los valores del eje *"x"*.

COPIA NO CONTROLADA

7.2.4.2.5 Obtenga con la regresión lineal anterior los valores del cuadro III

Cuadro III. Análisis de datos de regresión para la evaluación de veracidad.

	Coeficientes	**Error típico**	**Estadístico t**	**Probabilidad**
Intercepto (b)	= valor intercepto	= s_b	= ABS(b-0)*raíz(1)/s_b	=DISTR.T(t;GLR;2)
Pendiente (m)	= valor pendiente	= s_m	= ABS(m-1)*raíz(1)/s_m	=DISTR.T(t;GLR;2)

Donde: s_b = desviación estándar del intercepto, s_m = desviación estándar de la pendiente, ABS = valor absoluto, GLR = grados de libertad residuales, DISTR.T= es el cálculo de probabilidad de la distribución T, para el t calculado a dos colas.

7.2.4.2.6 Evalúe los resultados obtenidos del cuadro anterior de acuerdo a los siguientes criterios (7.20):

- Si la probabilidad en el intercepto es menor a 0,05, el intercepto es diferente de 0 y hay errores constantes en la metodología.
- Si la probabilidad en el intercepto es 0,05 o mayor, el intercepto no es diferente de 0 y no se presentan errores constantes en la metodología.
- Si la probabilidad en la pendiente es menor de 0,05, la pendiente es diferente de 1 y hay errores proporcionales en la metodología.
- Si la probabilidad en la pendiente es 0,05 o mayor, la pendiente no es diferente de 1 y no se presentan errores proporcionales en la metodología.

7.2.4.3 Método de estudios interlaboratorio (se dispone de estudios interlaboratorio):

Nota No 8: Los datos obtenidos a partir de los resultados interlaboratorio aportan información adicional para la evaluación de la veracidad del método, sin embargo no sustituye las determinaciones anteriores.

Siempre que sea posible, el laboratorio que verifique la implementación de un método de referencia a través de participaciones en Ensayos de Aptitud o Rondas de Comparación, debe asegurar que el material, muestra o equipo utilizado sea representativo de la realidad y trabajo rutinario del Laboratorio.

7.2.4.3.1 Evalúe la veracidad por medio del valor cuantificado del estudio interlaboratorio. Exprese la veracidad con la fórmula del sesgo (expresado como porcentaje):

$$\textbf{Porcentaje de sesgo} = \frac{(\text{Valor medio} - V_{LP}) * 100}{V_{LP}}$$

Donde: VLP es el valor promedio reportado para los laboratorios participantes.

COPIA NO CONTROLADA

7.2.4.3.2 Evalúe el desempeño de los resultados obtenidos para cada estudio interlaboratorial en el que haya participado. Para ello considere el uso de los estadísticos descritos en el anexo 9.

7.2.5 Evaluación de la eficiencia de la recuperación:

Nota No 9: La recuperación es un parámetro normalmente poco utilizado, tiene mayor importancia en métodos que incluyen etapas donde potencialmente puede alterarse la cantidad de analito en una muestra o disolución (ejemplo un método que incluye una o varias etapas de extracción) y donde las curvas de calibración no se realizan en matriz. Por lo anterior utilice este parámetro solo en la metodología que aplique su uso.

7.2.5.1 Obtenga una curva de calibración instrumental dentro del ámbito de linealidad de la metodología. Los niveles de la curva deben ser preparados sin matriz y no ser sometidos a los procesos de extracción.

7.2.5.2 Prepare tres niveles de concentración, de ser posible diferentes de los preparados para la curva de calibración, cada nivel como mínimo por sextuplicado (utilizando la misma disolución madre a la que se utilizó para preparar la curva de calibración) y por el método de adiciones (también conocido como fortificado o dopado), como se sugiere a continuación:

- Nivel bajo: idealmente la concentración que origina una respuesta igual a la del límite de cuantificación más dos desviaciones estándar del valor interpolado de concentración equivalente a dos desviaciones estándar de la señal del límite de cuantificación

- Nivel medio: valor central del ámbito de trabajo o valor de trabajo más frecuente.

- Nivel alto: idealmente límite superior del ámbito de trabajo menos el valor interpolado de concentración equivalente a dos desviaciones estándar de la señal del nivel más alto de la curva de calibración.

7.2.5.3 Cuantifique la concentración en la matriz fortificada con la curva de calibración instrumental preparada sin matriz y sin los procesos de extracción.

7.2.5.4 Calcule para cada nivel de concentración la eficiencia de la recuperación como porcentaje (valor obtenido/valor fortificado) *100.

$$\textbf{Eficiencia de la recuperación} = \frac{\text{(Valor obtenido)} * 100}{\text{Valor fortificado}}$$

7.2.6 Evaluación de la Precisión:

Utilice cualquier herramienta de análisis de varianza, como por ejemplo ANOVA, para evaluar la precisión. Si no se realiza este tipo de diseños en los siguientes apartados se detalla la forma como realizarlo.

COPIA NO CONTROLADA

7.2.6.1 Repetibilidad:

7.2.6.1.1 Si se dispone de MRC:

Calcule la desviación estándar y el coeficiente de variación de las determinaciones realizadas en la evaluación de veracidad.

7.2.6.1.2 Método de adiciones (no se dispone de MRC en matriz):

La precisión se puede expresar de dos maneras distintas en función de si hay o no homogeneidad en las dispersiones (ver prueba de Cochran 7.2.1.8)

Exprese la precisión, cuando es homocedástico, como el valor de la desviación estándar de regresión $S_{y/x}$.

Exprese la precisión, cuando es heterocedástico, por medio del cálculo de las desviaciones estándar y los coeficientes de variación de las determinaciones realizadas en cada nivel en la evaluación de veracidad por el método de adiciones.

COPIA NO CONTROLADA

7.2.6.2 Precisión intermedia:

7.2.6.2.1 Evaluación utilizando los niveles preparados para veracidad:

Realice las determinaciones con diferentes analistas y en diferentes días. Evalué en estas condiciones la desviación estándar y el coeficiente de variación en cada nivel. Considere los resultados de la prueba de Cochran para reportar la dispersión de la regresión o la dispersión para cada nivel.

7.2.6.2.2 Evaluación utilizando el efecto de una o más variables en la precisión intermedia por medio de los parámetros de la curva de calibración:

Evalúe por medio de un ANOVA de uno o más factores si la(s) variable(s) provoca(n) una diferencia significativa en dichos parámetros.

7.2.6.3 Reproducibilidad:

Si participa en un estudio interlaboratorial que le permita la determinación por replicado, compare la desviación estándar y el coeficiente de variación obtenidos para sus resultados con la desviación estándar y el coeficiente de variación que se indica en el reporte oficial de la prueba, y exprese la diferencia como porcentaje.

7.2.7 Evaluación de la Selectividad/Especificidad.

7.2.7.1 Agregue a cada una de las matrices del alcance del método (MRC en matriz ó preparada por el método de adiciones) sustancias que pueden encontrarse presentes en las muestras a analizar, en la concentración a la que se encuentran los interferentes en el trabajo

de rutina. Esto no debe limitar que sea necesario fortificar con el interferente a niveles de concentración mayores según el método particular.

Por ejemplo: en el caso de métodos inmunológicos para muestras biológicas se puede adicionar sustancias que presentan reacción cruzada.

7.2.7.2 Realice por quintuplicado la determinación de veracidad (7.2.4) y precisión (7.2.6) al MRC en matriz o al preparado por el método de adiciones dopado con interferentes.

En el caso de metodologías cromatográficas con detectores selectivos o universales, la selectividad del método se puede evaluar con el uso de tiempos de retención absolutos, índices de retención relativos, coeficientes de variación de los índices de retención o tiempos de retención, resolución cromatográfica, pureza de pico, intensidad de iones, etc.

La selectividad y especificidad deben cumplir con los criterios establecidos en el punto 2.1 del formulario "Informe de Validación". La validación debe garantizar que el propósito del método se cumple y que se conoce el efecto de impurezas e interferencias.

Si la presencia de un interferente, enmascarante o inhibidor no permite cumplir con lo establecido en los parámetros, la presencia de esta sustancia obliga a que se indique que el método tiene su alcance limitado a muestras libres de dicha sustancia (interferente, enmascarante o inhibidor).

COPIA NO CONTROLADA

7.2.8 Evaluación de la Robustez:

7.2.8.1 Se dispone de MRC en matriz:

Idealmente utilice un MRC en la matriz de análisis al menos en un nivel igual al valor central del ámbito de trabajo o valor de trabajo más frecuente. Continúe con el punto "selección de factores".

7.2.8.2 Método de adiciones (no se dispone de MRC en matriz):

7.2.8.2.1 Prepare cantidad suficiente de una matriz en la que se aplica el método.

7.2.8.2.2 Prepare (preferiblemente a partir de una disolución madre, diferente a la que se utilizó para preparar la curva de calibración) y por el método de adiciones (también conocido como fortificado o dopado), una concentración (cuando sea posible diferente de las preparadas para la curva de calibración), igual al valor central del ámbito de trabajo o valor de trabajo más frecuente. Continúe con el punto "selección de factores".

7.2.8.3 Selección de los factores:

7.2.8.3.1 Identifique no más de 7 factores del método. Por ejemplo, seleccione condiciones de matriz (muestras hiperproteícas, hiperlipídicas, descompuestas, con diferentes valores de pH o salinidad), de metodología, instrumentales, de analista y ambientales de las que se puede esperar algún efecto o interacción cuando el método es aplicado. Factores típicos son: tipo de matriz, tiempo, tipo o concentración de reactivos, humedad, variaciones en la matriz, condiciones aceleradas de estrés como calentamiento por un tiempo, acidificación, entre otras.

7.2.8.3.2 Establezca para cada factor, además del valor del PON específico de la metodología a validar (condición base) condiciones alternativas las cuales pueden ser un valor mayor (+) y un valor menor (-) que el establecido en el PON de la metodología a validar o la ausencia de algún componente (-) y presencia del componente (+).

7.2.8.3.3 Opte por el diseño factorial incompleto (4.2.8.4) cuando el número de factores seleccionado sea de 7 o por el diseño factorial completo (4.2.8.5) cuando el número de factores seleccionado es igual o menor a 4. Entre 5 y 6 factores la decisión se toma en función de los recursos disponibles.

7.2.8.4 Diseño factorial incompleto:

7.2.8.4.1 Genere por medio de algún software estadístico la matriz de diseño experimental o prepare una matriz de combinación de ocho experimentos con siete factores (A,B,C,D,E,F y G) tal y como se ilustra en el cuadro IV.

Cuadro IV: Ejemplo de un diseño factorial incompleto.

Experimento	Combinación de factores						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	-	-	-
3	+	-	+	-	+	-	-
4	+	-	-	-	-	+	+
5	-	+	+	-	-	+	-
6	-	+	-	-	+	-	+
7	-	-	+	+	-	-	+
8	-	-	-	+	+	+	-

Estas combinaciones fueron escogidas de tal forma que siempre en cuatro experimentos se encuentre un factor en el nivel bajo (-) y en los otros cuatro en el nivel alto (+).

7.2.8.4.2 Realice por duplicado los ocho experimentos.

7.2.8.4.3 Evalúe, por ejemplo, el efecto del factor "A" calculando la diferencia entre la media de los experimentos 1 a 4 menos la media de los experimentos 5 a 8. Para cada factor, esta diferencia se tabula y su valor absoluto se ordena de mayor a menor. Las diferencias cuyos valores absolutos sean mayores, serán los factores más críticos y el signo indica la dirección del efecto (idealmente analice todos, sin embargo si tuviera que priorizar analice cual de estos de presentarse tiene más magnitud en el análisis o que este más propenso a presentarse).

7.2.8.4.4 Establezca, a partir de los resultados obtenidos en las pruebas t y F (ver anexo. No. 2) utilizando una probabilidad de 0,05 (ver anexo 06) cuáles son los factores que presentan los efectos más importantes, Los factores que den una importancia superior al 95% deberán ser controlados de manera más estricta durante la ejecución de la metodología.

COPIA NO CONTROLADA

7.2.8.5 Diseño factorial completo:

7.2.8.5.1 Genere una matriz de diseño experimental con un software estadístico o prepare una matriz de combinación de experimentos y factores. En el cuadro V se ilustra como ejemplo una matriz de dieciséis experimentos y cuatro factores.

Cuadro V: Ejemplo de un diseño factorial completo

Experimento	Combinación de factores			
	A	B	C	D
1	+	+	+	+
2	-	+	+	+
3	+	-	+	+
4	-	-	+	+
5	+	+	-	+
6	-	+	-	+
7	+	-	-	+
8	-	-	-	+
9	+	+	+	-
10	-	+	+	-
11	+	-	+	-
12	-	-	+	-
13	+	+	-	-
14	-	+	-	-
15	+	-	-	-
16	-	-	-	-

COPIA NO CONTROLADA

7.2.8.5.2 Realice al menos por duplicado los experimentos.

7.2.8.5.3 Calcule para medir, por ejemplo, el efecto del factor "A", la diferencia entre la media de los experimentos impares y la media de los experimentos pares. Para cada factor, esta diferencia se tabula y su valor absoluto se ordena de mayor a menor. Las diferencias cuyos valores absolutos sean mayores, serán los factores más críticos y el signo indica la dirección del efecto. El enfoque matricial se presenta en el anexo 06.

7.2.8.5.4 Analice con el software correspondiente los resultados obtenidos o como alternativa con las pruebas t y F que se muestran en el anexo 06.

7.2.8.5.5 Establezca cuáles son los factores que presentan los efectos y las interacciones más importantes (ver anexo 06), los factores que den una importancia superior al 95% deberán ser controlados de manera más estricta durante la ejecución de la metodología. Lo anterior es equivalente a que los parámetros estadísticos "t de Student" o "F" son mayores a los valores críticos o de tabla para los grados de libertad de los análisis del efecto o interacción de los factores.

7.3 Validación de métodos de análisis de clasificación y de identificación química:

Nota No 10: Por las particularidades de una metodología puede requerirse utilizar una forma diferente para la estimación de un parámetro determinado, acorde con lo que sea aceptado para la evaluación del desempeño por la Comunidad Científica. Como por ejemplo lo estipulado en el documento: "ANSI/ASB Standard 036, First Edition 2019. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology." que aplica en el área de Toxicología Forense o al documento "Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) Recommendations. Versión 7.0; Part IV B Quality Assurance / Validation of Analytical Methods, 2014; pp. 43–48.", este último se contempla en la norma E2549 de ASTM y que aplica en el análisis de drogas de decomiso. Las referencias, el procedimiento y las herramientas estadísticas utilizadas deberán describirse y anexarse al plan e informe de validación respectivo.

En caso de que no se pueda seguir lo indicado en este procedimiento se debe dejar documentado de manera explícita y detallada el motivo de lo anterior (indicando de ser posible referencias bibliográficas) y la forma en que se procedió a determinar un parámetro de validación, lo anterior por medio del plan y el informe de validación.

COPIA NO CONTROLADA

7.3.1 Evaluación del límite de detección:

Evaluación del límite de detección para métodos instrumentales con respuesta analítica numérica (área, altura, intensidad, entre otros):

Proceda como se indica en el punto 7.3.1.1., si el método que se está validando utiliza una curva de calibración; en caso contrario seleccione (de acuerdo con la experiencia del analista) entre alguna de las opciones que más se ajuste a la metodología particular y según se describe en 7.3.1.2, 7.3.1.3, 7.3.1.4, 7.3.1.5 ó 7.3.1.6.

Posterior a su estimación, el límite de detección debe ser comprobado experimentalmente como se indica en 7.3.1.8.

7.3.1.1 Estimación por Curva de Calibración:

7.3.1.1.1 Prepare una curva de calibración considerando lo siguiente:

- Si el método presenta linealidad en un orden de magnitud, prepare la curva de calibración abarcando el intervalo lineal o intervalo de trabajo (al menos cinco niveles). Para esto utilice los resultados de las mediciones obtenidas en 7.2.1.

- En caso de que la curva de calibración sea lineal en varios órdenes de magnitud, construya una curva de calibración incluyendo sólo concentraciones en el orden de magnitud más bajo (al menos cinco niveles), para lo anterior aplique lo indicado en el punto 7.2.1.

- Valore preliminarmente la respuesta instrumental para bajas concentraciones del analito a partir de datos derivados de la literatura, parámetros reportados por el fabricante del equipo utilizado o basado en experiencias previas realizadas en el laboratorio con el fin de estimar el ámbito donde posiblemente se encuentre el límite de detección.

7.3.1.1.2 Realice un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados y obtenga la relación expresada como una recta de tipo:

$$y = m\,x + b$$

Para esto y los pasos subsiguientes utilice una calculadora, una hoja de cálculo, el software de procesamiento de datos del equipo o un software estadístico.

7.3.1.1.3 Obtenga los valores de desviación estándar de la pendiente "s_m", de desviación estándar del intercepto "s_b" y desviación estándar de regresión $S_{y/x}$.

7.3.1.1.4 Estime el límite de detección empleando una de las siguientes opciones de acuerdo a su aplicabilidad al método de análisis específico.

COPIA NO CONTROLADA

7.3.1.2 Estimación por señal de ruido:

En el caso de las técnicas cromatográficas y microanálisis de rayos X, entre otras, dicha estimación puede realizarse por medio de la desviación del ruido en un intervalo de valoración o a partir de la relación entre la señal y la magnitud del ruido en un intervalo. Calcule el LD como 3 veces la señal del ruido "SR" (ver anexo 04).

7.3.1.3 Estimación por señal de blanco: (cuando se obtiene señal o respuesta analítica con el blanco)

Verifique mediante la lectura de al menos diez preparaciones de blanco, si con ellos obtiene alguna respuesta o señal analítica. En caso afirmativo, la estimación del límite de detección puede realizarse como 3 veces la desviación estándar de la señal del blanco "SB" entre la pendiente o con la siguiente ecuación cuando se quiere considerar la ponderación numérica del número de réplicas del número de blancos utilizados.

$$LD = \frac{3\ S_B}{m\ \sqrt{n}}$$

Donde *"m"* es el valor de la pendiente, *"SB"* es la desviación estándar de la señal del blanco y *"n"* es el número de réplicas del blanco.

7.3.1.4 Método de la desviación estándar del blanco estimada como la desviación estándar de regresión o desviación de los errores aleatorios en la dirección "y" de la curva de calibración (SB = $S_{y/x}$):

Utilice los datos de pendiente "m" y desviación estándar de regresión de la curva ($S_{y/x}$) para estimar el límite de detección con la fórmula siguiente:

$$LD = 3S_{y/x}/m$$

Donde "m" es el valor de la pendiente y "$S_{y/x}$" es la desviación estándar de regresión o desviación de los errores aleatorios en la dirección "y" de la curva de calibración; utilizada en esta fórmula como estimación de la desviación estándar del blanco.

7.3.1.5 Método del corredor de errores:

Obtenga, cuando el intercepto es positivo, el corredor de error superior (α = 0,05 ó 0,01) cuando la curva corta el eje Y (Xi=0). Con este valor del corredor de error superior, estime con la fórmula de la curva el límite de detección como el valor correspondiente a la concentración (ver Anexo 05).

7.3.1.6 Método del corredor de errores para intercepto negativo:

Obtenga, cuando el intercepto es positivo, el corredor de error superior (α = 0,05 ó 0,01) cuando la curva corta el eje X (Yi=0). Con este valor del corredor de error superior, estime con la fórmula de la curva el límite de detección como el valor correspondiente a la concentración (ver Anexo 05).

7.3.1.7 Método de la desviación del intercepto

Obtenga, cuando el intercepto es positivo, el valor para la dispersión del intercepto (s_b). Con este valor multiplicado por 3 y el valor de la pendiente del ajuste, obtenga el LD con la siguiente fórmula (el límite de detección como el valor correspondiente a la concentración):(ver Anexo 05).

$$\mathbf{LD = 3\, s_b / m}$$

7.3.1.8 Comprobación experimental del LD:

Compruebe experimentalmente el LD preparando al menos por duplicado una disolución. Si no se observa señal analítica, continúe preparando disoluciones más concentradas hasta observar señal analítica con una razón señal / ruido mayor a 3 y reporte este resultado como el LD de la metodología.

Para las pruebas de color y TLC hacer la comprobación del límite de detección con 10 determinaciones y no debe obtenerse un falso negativo en más del 20% de las determinaciones.

7.3.1.8.1 Evaluación del límite de detección para métodos sin respuesta analítica numérica (pruebas de color, TLC, entre otros):

Nota No 11: la determinación del límite de detección no aplica para la prueba de identificación por FTIR.

COPIA NO CONTROLADA

Prepare una disolución o mezcla homogénea madre conteniendo el analito a un nivel de concentración mayor y cercano al límite de detección esperado (es un método que se ha usado por bastante tiempo, por tanto se supone que se conoce o se tiene una idea del límite de detección esperado, de lo contrario consulte bibliografía).

Aplique la metodología a diluciones sucesivas de la disolución o mezcla homogénea madre de forma que visualmente o instrumentalmente se llegue a establecer la concentración menor que permite ser detectada. Se debe comprobar dicho límite mediante el análisis de 10 réplicas. Según las directrices de la oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.

Estime el límite de detección como la menor concentración para las que se obtenga respuesta positiva para cada una de ellas.

Nota No 12: Para aquellas metodologías de identificación de sustancias biológicas (por ejemplo sangre o fluidos), la estimación del límite de detección se realizará por medio de la dilución adecuada del analito o matriz en el medio correspondiente, efectuando las pruebas a cada nivel de dilución.

COPIA NO CONTROLADA

7.3.2 Precisión:

7.3.2.1Para pruebas de color y pruebas espetroscópicas

7.3.2.1.1 Repetibilidad

Analice al menos 10 réplicas de muestras de composición conocida en un nivel de concentración de 2 veces el límite de detección y tabule los resultados obtenidos (positivos y falsos negativos), no debe obtenerse más de un falso negativo en cada cinco muestras analizadas es decir: 20%. Según las directrices de la oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.

7.3.2.1.2 Precisión intermedia

Realice el análisis anterior en condiciones de precisión intermedia (diferentes días, analistas, según aplique) y tabule los resultados obtenidos (positivos y falsos negativos), no debe obtenerse más de un falso negativo en cada cinco muestras analizadas es decir: 20%. Según las directrices de la oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.

7.3.2.2 Para técnicas cromatográficas (capa fina, cromatografía de gases y líquida):

7.3.2.2.1 Repetibilidad:

Determine la variación en condiciones de repetibilidad de los parámetros de identificación de la metodología (por ejemplo: Rf, tiempo de retención, índice de retención, intensidad relativa de los iones,). Calcule el coeficiente de variación relativo de las 10 réplicas. Lo anterior, se debe realizar a 2 niveles (dos veces el límite de detección y a otro nivel de trabajo de acuerdo a la metodología).

7.3.2.2.2 Precisión intermedia :

Determine la variación en condiciones de precisión intermedia de los parámetros de identificación de la metodología (por ejemplo: Rf, tiempo de retención, índice de retención, intensidad relativa de los iones,). Calcule el coeficiente de variación relativo de las 10 réplicas. Lo anterior, se debe realizar a 2 niveles (dos veces el limite de detección y a otro nivel de trabajo de acuerdo a la metodología).

7.3.3 Evaluación de la eficiencia de la recuperación:

Nota No 13: La recuperación es un parámetro normalmente poco utilizado, tiene mayor importancia en métodos que incluyen etapas donde potencialmente puede alterarse la cantidad de analito en una muestra o disolución (ejemplo un método que incluye una o varias etapas de extracción) y donde las curvas de calibración no se realizan en matriz. Por lo anterior utilice este parámetro solo en la metodología que aplique su uso.

7.3.3.1 Obtenga una curva de calibración instrumental dentro del ámbito de linealidad de la metodología. Los niveles de la curva deben ser preparados sin matriz y no ser sometidos a los procesos de extracción.

7.3.3.2 Prepare tres niveles de concentración, de ser posible diferentes de los preparados para la curva de calibración, cada nivel como mínimo por sextuplicado (utilizando la misma disolución madre a la que se utilizó para preparar la curva de calibración) y por el método de adiciones (también conocido como fortificado o dopado), como se sugiere a continuación:

- Nivel bajo: idealmente la concentración que origina una respuesta igual a la del límite de cuantificación más dos desviaciones estándar del valor interpolado de concentración equivalente a dos desviaciones estándar de la señal del límite de cuantificación
- Nivel medio: valor central del ámbito de trabajo o valor de trabajo más frecuente.
- Nivel alto: idealmente límite superior del ámbito de trabajo menos el valor interpolado de concentración equivalente a dos desviaciones estándar de la señal del nivel más alto de la curva de calibración.

7.3.3.3 Cuantifique la concentración en la matriz fortificada con la curva de calibración instrumental preparada sin matriz y sin los procesos de extracción.

7.3.3.4 Calcule para cada nivel de concentración la eficiencia de la recuperación como porcentaje (valor obtenido/valor fortificado) *100.

$$\textbf{Eficiencia de la recuperación} = \frac{\text{(Valor obtenido) * 100}}{\text{Valor fortificado}}$$

COPIA NO CONTROLADA

7.3.4 Evaluación de la selectividad y especificidad:

La verificación de la selectividad se realiza analizando muestras de los distintos tipos de matrices (incluidas en el alcance del método) sin el o los analito(s) de interés y con el o los analito(s) de interés, las cuales se pueden preparar mediante el método de adiciones.

7.3.4.1 Pruebas no cromatográficas (como pruebas a la gota, pruebas con umbral, inmunoensayos que no ofrecen un resultado semicuantitativo, entre otros):

7.3.4.1.1 Prepare cantidad suficiente de una muestra de una matriz para realizar al menos 20 determinaciones independientes.

7.3.4.1.2 Distribuya estas muestras entre los analistas que realizan estas pruebas, de manera tal que se mantenga la condición de pruebas ciegas.

7.3.4.1.3 Recopile los resultados y estime los parámetros según se indica a continuación. Repita los dos puntos anteriores para una muestra de una matriz con analito seis veces el límite de detección.

7.3.4.1.4 Estime los siguientes parámetros:

-Razón de Falsos Positivos (RFP): número de veces que se detecta el analito sin que esté presente en la muestra.

-Razón de Falsos Negativos (RFN): número de veces que no se detecta el analito estando presente en la muestra.

- Razón de Eficiencia (R Efi): razón de análisis correctos con respecto al número total de análisis realizados.

- Razón de Selectividad / sensibilidad (R Sel/ Sen): razón de veces que se detecta el analito con respecto las muestras positivas analizadas.

- Razón de Especificidad (R Esp): razón de veces que no se detecta el analito con respecto a las muestras negativas analizadas.

En el anexo 10 se ejemplifica el cálculo de estas razones.

Los criterios de aceptación y rechazo, se establecen para cada prueba específica dentro de un área pericial, según los requerimientos de cada metodología.

Si la presencia de un interferente, enmascarante o inhibidor no permite cumplir con lo establecido en los parámetros, la presencia de esta sustancia obliga a que se indique que el método tiene su alcance limitado a muestras libres de dicha sustancia (interferente, enmascarante o inhibidor).

COPIA NO CONTROLADA

7.3.4.2 Pruebas cromatográficas:

7.3.4.2.1 En el caso de metodologías cromatográficas con detectores selectivos o universales, la selectividad del método se puede evaluar con el uso de tiempos de retención absolutos, índices de retención relativos, coeficientes de variación de los índices de retención o tiempos de retención, resolución cromatográfica, pureza de pico, intensidad de iones, supresión iónica, etc.

7.3.4.2.2 La selectividad y especificidad deben cumplir con los criterios establecidos en el punto 2.1 del formulario "Informe de Validación". La validación debe garantizar que el propósito del método se cumple y que se conoce el efecto de impurezas e interferencias.

7.3.5 Evaluación del grado de certeza (exactitud) y reproducibilidad

7.3.5.1 Si se dispone de resultados de estudios interlaboratoriales:

7.3.5.2 Obtenga el valor del porcentaje de aciertos por cada funcionario participante y el porcentaje de aciertos global por prueba interlaboratorio de todos los funcionarios, entendiéndose como acierto un resultado correspondiente al aceptado como verdadero. (ver anexo 11)

7.3.5.3 Evalué si existe o no diferencia significativa entre los resultados de los analístas (precisión intermedia), el grado de certeza (exactitud) y la reproducibilidad, utilizando las herramientas estadísticas más adecuadas para el conjunto de datos. Por ejemplo prueba de chi-cuadrado para determinar precisión intermedia, exactitud y reproducibilidad (ver anexo 7) y la prueba de Wilcoxon para determinar precisión intermedia y reproducibilidad.

COPIA NO CONTROLADA

7.3.6 Evaluación de la robustez

7.3.6.1 Determine si existen magnitudes de influencia que podrían afectar el resultado de una metodología particular, principalmente en aspectos relacionados con eficiencia de la recuperación y estabilidad de muestras (recibidas, preparadas y extraídas).

7.3.6.2 Enliste las magnitudes de influencia si las hay.

7.3.6.3 Evalúe estadísticamente el efecto de cada una de las magnitudes de influencia, así como la importancia del mismo, justificando la estrategia experimental utilizada.

7.4 Validación de Métodos de Análisis interpretativos:

Nota No 14: Durante la validación únicamente se debe considerar peritos competentes, siendo que cada vez que una persona adquiera competencia deberá incorporarse a la validación del método respectivo.

7.4.1 Para la validación de métodos de análisis interpretativos se requiere demostrar que los analistas pueden generar resultados consistentes, reproducibles, válidos y confiables, los cuales

deben ser compatibles con los resultados del resto de los analistas competentes del laboratorio. Esto se puede lograr a través de la evaluación de la veracidad (grado de certeza), precisión intermedia y/o reproducibilidad.

La estrategia de validación, tratamiento estadístico y criterios de aceptación y rechazo serán establecidos en cada plan de validación en función del área pericial particular y deberán quedar referenciados en el informe de validación.

La información necesaria para la evaluación de estos parámetros puede recopilarse según lo establecido en el cuadro siguiente:

Cuadro VI. Estrategias para la evaluación de los parámetros de validación en los métodos de análisis interpretativos

Estrategia	Parámetro a evaluar según estrategia.	Herramienta estadística recomendada
Participación en pruebas de competencia interlaboratoriales.	precisión intermedia	Chi-cuadrado (ver anexo 7)
	Veracidad (grado de certeza)	Evaluación del porcentaje de acierto (ver anexo 7)
	reproducibilidad	Wilcoxon (ver anexo 11)
Diseño de pruebas de competencia intralaboratoriales.	precisión intermedia	Chi-cuadrado (ver anexo 7)
	Veracidad (grado de certeza)	Evaluación del porcentaje de acierto (ver anexo 7)
Diseño de pruebas de validación.	precisión intermedia	Chi-cuadrado (ver anexo 7)
	Veracidad (grado de certeza)	Evaluación del porcentaje de acierto (ver anexo 7)
Confirmación independiente de resultados de un analista por otro analista competente (sin conocimiento previo del resultado del primer analista).	precisión intermedia en el análisis de casos reales.	Wilcoxon (ver anexo 12)

COPIA NO CONTROLADA

Nota No 15: Para evaluar la reproducibilidad compare la frecuencia observada de acierto para cada prueba interlaboratorial (tomando en cuenta los resultados de los analistas participantes) con el nivel de certeza promedio alcanzado globalmente por los demás laboratorios, en cada una de las pruebas interlaboratoriales en las que ha participado la Sección. Utilice para esto la herramienta estadística (paramétrica o no paramétrica) que el líder técnico en conjunto con el personal competente encargado de la validación considere más adecuada, dependiendo de la cantidad y comportamiento de los datos con los que se cuente, por ejemplo prueba de chicuadrado, prueba de rangos y signos de Wilcoxon u otra.

Nota No 16: Considerando que los estudios interlaboratoriales en algunas áreas forenses no reflejan la complejidad y la realidad de los casos recibidos en el laboratorio durante trabajo

rutinario, la evaluación del desempeño solo con este tipo de pruebas podría estar sobrestimada. Debido a ello es deseable que las pruebas interlaboratoriales sean complementadas mediante el diseño y aplicación de pruebas intralaboratoriales o pruebas de validación que tomen en cuenta diferentes variables como la complejidad de los ítems analizados, el estado de conservación de los mismos, el sesgo de confirmación y otros aspectos que puedan ser de interés para la medición de la competencia.

Nota No 17: Los parámetros se deben adecuar a los recursos con que cuente la Sección para la evacuación de las respectivas pericias, por ejemplo, un análisis con perito único no podrá ser sometido a evaluación de precisión intermedia."

7.4.2 Posterior a la validación del método, cuando se realicen pruebas interlaboratoriales e intralaboratoriales, incorpore los resultados a la hoja de cálculo en donde se registraron los resultados de la validación del método.

7.4.3 Luego de que un analista adquiera competencia deberá ser incluido en la validación del método correspondiente, para esto entregue al analista, como encargado(a) de calidad de la sección o quien la jefatura designe. Para esto haga uso de una estrategia de validación (ver cuadro VI) y tome en cuenta lo siguiente:

7.4.3.1 Para métodos no destructivos, seleccione una de las siguientes opciones:

a) la última prueba utilizada en la validación del método siempre y cuando no conozca el resultado, de forma que los resultados puedan ser comparados con los de los demás analistas competentes.

b) Una nueva prueba, que debe ser realizada por todos los peritos competentes, la cual debe ser resulta en un lapso corto de tiempo.

7.4.3.2 Para métodos destructivos proceda a diseñar una prueba de validación con similares características a la última prueba utilizada en la validación.

Nota No 18: La incorporación de un analista competente a la validación del método debe ser posterior a la conclusión aceptable del periodo de revisión por pares al 100%.

Nota No 19: Si dentro de los parámetros de validación se requiere evaluar la reproducibilidad se deberá esperar el siguiente periodo de pruebas interlaboratoriales.

7.4.4 Incluya los resultados obtenidos por el analista dentro de las hojas de cálculo, y evalúe los parámetros de validación con la herramienta estadística seleccionada. En caso de obtener valores no concordantes o no aceptables en las pruebas de validación proceda a realizar lo indicado en el Procedimiento de Control de trabajo no conforme, acciones correctivas, acciones preventivas y mejoras. Lo anterior, exceptuando las pruebas de validación que involucren la metodología de revelado de superficies, ya que se deberá valorar si un error reportado en una prueba de validación se debe a la naturaleza de la muestra.

COPIA NO CONTROLADA

7.5 Validación de métodos de identificación por ADN:

La mayoría de los métodos utilizados de rutina en los laboratorios forenses que realizan análisis de ADN han sido desarrollados y validados por casas comerciales y/o diferentes laboratorios y sus resultados han sido publicados en revistas científicas de renombre, antes de salir al mercado. En esos casos, el laboratorio, debe realizar estudios de verificación de los métodos que se quieren implementar, con el objetivo de comprobar que las análisis realizados en el laboratorio producen resultados óptimos, reproducibles y en concordancia con lo esperado y obtenidos en otros laboratorios.

7.5.1 Validación de Termociclador en Tiempo Real ABI7500:

7.5.1.1 Realice cinco cuantificaciones de ADN en días diferentes con la utilización de pipetas previamente verificadas (ver Pon de Gestión de Casos e Interpretación de resultados) y los kits comerciales de cuantificación (ver Pon para la Cuantificación de ADN utilizando el termociclador por Tiempo Real ABI7500) y registre los datos que se obtienen de cada corrida.

7.5.1.1.1 Los datos a registrar son los referentes a cada uno de los puntos que compone la pendiente de la curva estándar, la linealidad de la recta de mejor ajuste o R^2 y los controles positivo y negativo de la PCR de cuantificación.

7.5.1.1.2 No se debe realizar alguna corrección o eliminación de ningún punto de la pendiente

7.5.1.2 Para evaluar reproducibilidad y repetibilidad, anote el CT (el umbral de ciclos, o sea el número de ciclos requeridos en una PCR de tiempo real para generar una cantidad predeterminada de producto) para cada una de las diluciones cuantificadas y calcule la desviación estándar. Los datos se deben registrar de la siguiente manera:

Concentración ADN (curva estándar ng/µL)	Corrida # 1 (CT)	Corrida # 2 (CT)	Corrida # 3 (CT)	Corrida # 4 (CT)	Corrida # 5 (CT)	Promedio de CT`s
50,000						
5,0000						
0,5000						
0,0500						
0,0050						
Pendiente						
Promedio de R2						
Promedio de las Pendientes						

COPIA NO CONTROLADA

7.5.1.3 De esta manera, se puede calcular las varianzas entre corridas de acuerdo a los valores de CT y trazar los parámetros de aceptación de la cuantificación de acuerdo a lo recomendado por la casa comercial y lo establecido por el laboratorio así como determinar el rango de linealidad aceptable para las corridas de cuantificación.

7.5.2 Verificación de Procedimientos de extracción de ADN:

7.5.2.1 Seleccione una muestra control de ADN de perfil genético conocido (control positivo) (puede utilizar el control de extracción de sangre para todos los tipos de extracción y/o el control de extracción especifico para cada fluido biológico a analizar) y una muestra control negativo.

7.5.2.2 Realice el proceso de extracción específico para cada fluido biológico, al menos en tres ocasiones. (ver procedimiento respectivo para cada uno de los tipos de extracción realizados en la Sección de Genética Forense).

7.5.2.2.1 En caso de utilizar un proceso de extracción automatizado y/o semi-automatizado, utilice el protocolo establecido por la casa comercial para cada fluido biológico.

7.5.2.3 Realice el proceso de cuantificación de las muestras (ver Pon para la Cuantificación de ADN utilizando el termociclador por Tiempo Real ABI7500)

7.5.2.4 Realice el proceso de amplificación de marcadores genéticos. (ver PON de Amplificación de Marcadores Genéticos por la reacción en cadena de la polimerasa)

7.5.2.5 Realice el proceso de electroforesis capilar. (ver PON para el Uso y Manejo del Analizador Genético ABI3500)

7.5.2.5.1 El perfil obtenido en control positivo deberá coincidir en todos los marcadores amplificados al perfil de referencia (Ver Pon de Gestión de Casos e Interpretación de resultados). El control negativo debe presentar una ausencia de marcadores genéticos. (Pon de Gestión de Casos e Interpretación de resultados) Todo resultado fuera de estos criterios se debe considerar inaceptable.

COPIA NO CONTROLADA

7.5.3 Validación del equipo de electroforesis capilar ABI3500:

7.5.3.1 Validación de la Varianza Intercapilar:

7.5.3.1.1 La primera vez que valide el equipo, cuando se realice un cambio de capilar en el equipo y/o a solicitud de la Jefatura de Sección, Líder Técnico y/o el Encargado de Calidad de la Sección, proceda a realizar una verificación de la varianza Intercapilar del equipo de electroforesis capilar.

7.5.3.1.2 Seleccione una muestra de ADN de perfil conocido, se recomienda utilizar el control positivo que viene con los kits comerciales.

7.5.3.1.3 Realice al menos 3 amplificaciones en reacción completa, del control y/o la muestra escogida, utilizando el kit Global Filer u otro kit de amplificación validado que contenga, de ser posible, el alelo 9.3 en el marcador TH01. (ver PON de Amplificación de Marcadores Genéticos por la reacción en cadena de la polimerasa).

7.5.3.1.4 Una vez amplificado el control proceda a realizar el montaje de una solución homogénea utilizando el siguiente esquema:

	1X	45X
Formamida Hi Di	9,5ul	427,5ul
LIZ 600	0,5ul	22,5ul
ADN	1ul	45ul

7.5.3.1.5 Proceda a colocar 10ul de la solución homogénea de acuerdo al siguiente diagrama:

	1	2	3	4	5	6
A	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ladder
B	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	
C	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	
D	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	
E	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	
F	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	
G	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	
H	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ctl	Ladder

COPIA NO CONTROLADA

7.5.3.1.6 Realice el proceso de electroforesis capilar en el analizador genético ABI3500 o similar utilizando el protocolo establecido para el kit comercial escogido (ver PON para el Uso y Manejo del Analizador Genético ABI3500).

7.5.3.1.7 Analice los resultados en el GeneMapper ID-x utilizando el método de análisis para el kit comercial escogido (ver PON para el Uso y Manejo del Analizador Genético ABI3500 y Pon de Gestión de Casos e Interpretación de resultados).

7.5.3.1.8 Respalde al menos 1 electroferograma por procedimiento en formato pdf.

7.5.3.1.9 Exporte la tabla de resultados conteniendo la información de posición (alelo) y altura de los picos (RFUs) o en su defecto utilice los electroferogramas como referencia.(ver PON para el Uso y Manejo del Analizador Genético ABI3500)

7.5.3.1.10 Calcule el porcentaje de varianza utilizando la hoja de calculo H-DCF-ECT-BQM-09.

7.5.3.1.10.1 Para verificar los criterios de aceptación y rechazo ver Procedimiento de Gestión de Casos, Sección de Genética Forense.

7.5.3.2 Evaluación de la contaminación mecánica:

7.5.3.2.1 La primera vez que valide el equipo, cuando se realice un cambio de capilar en el equipo y/o a solicitud de la Jefatura de Sección, Líder Técnico y/o el Encargado de Calidad de la Sección, proceda a realizar una verificación de la ausencia de contaminación mecánica del equipo de electroforesis capilar.

7.5.3.2.2 Realice el montaje de una placa óptica de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco
B	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder
C	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco
D	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder
E	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco
F	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder
G	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco
H	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder	blco	lder

Lder: Escalera alelica, blco: Blanco de reactivos

7.5.3.2.2.1 En caso de no contar con suficientes escaleras alélicas, puede utilizar un control de amplificación positivo.

7.5.3.2.3 Realice el proceso de electroforesis capilar en el analizador genético ABI3500 o similar utilizando el protocolo establecido para el kit comercial escogido (ver PON para el Uso y Manejo del Analizador Genético ABI3500).

7.5.3.2.4 Analice los resultados en el GeneMapper ID-x utilizando el método de análisis para el kit comercial escogido (ver PON para el Uso y Manejo del Analizador Genético ABI3500 y Pon de Gestión de Casos e Interpretación de resultados).

7.5.3.2.5 Respalde al menos 1 electroferograma por procedimiento.

7.5.3.2.6 Exporte la tabla de resultados conteniendo la información de posición (alelo) y altura de los picos (RFUs) o en su defecto utilice los electroferogramas como referencia.(ver PON para el Uso y Manejo del Analizador Genético ABI3500).

7.5.3.2.7 Compruebe la ausencia de contaminación en los blancos de montaje, mediante la ausencia de picos electroforéticos que correspondan a alelos en los blancos de montaje.

COPIA NO CONTROLADA

7.5.4 Validación de los Kits de amplificación de marcadores genéticos. Linealidad (límite de detección) y Umbral Estocástico.

7.5.4.1 Preparación de una muestra simulada:

7.5.4.1.1 Seleccione una muestra control con perfil genético conocido. (como referencia se puede utilizar el control de PCR 2800M Promega, el cual según el fabricante contiene 10ng/ul). De utilizar otro control deberá ajustar los volúmenes a la cantidad de ADN requerida (valor X).

7.5.4.1.2 Cuantifique la muestra control con perfil genético conocido escogida por triplicado (ver Pon para la Cuantificación de ADN utilizando el termociclador por Tiempo Real ABI7500)

7.5.4.1.3 Prepare las muestras simuladas de acuerdo al siguiente cuadro de diluciones seriadas:

	ADN (ng)
8X	8
4X	4
2X	2
X	1
1/2X	0,5
1/4X	0,25
1/8X	O,125
1/16X	0,0625
1/32X	0,03125

COPIA NO CONTROLADA

7.5.4.2 Determinación del volumen mínimo de reacción de amplificación, límite de detección, el umbral analítico y el umbral estocástico::

7.5.4.2.1 Se debe determinar cual es volumen mínimo de reacción que permita obtener perfiles genéticos que cumplan los criterios de calidad de la Sección de Genética Forense. (ver Procedimiento de Gestión de Casos e interpretación de resultados, Sección de Genética Forense).

7.5.4.2.2 Se debe determinar cual es la cantidad mínima de ADN (en ng) que permita obtener perfiles genéticos que cumplan los criterios de calidad de la Sección de Genética Forense**.** (ver Procedimiento de Gestión de Casos e interpretación de resultados, Sección de Genética Forense).

7.5.4.2.3 Se debe determinar cuales son los umbrales analíticos y estocásticos que permitan obtener perfiles genéticos que cumplan los criterios de calidad de la Sección de Genética Forense (ver Procedimiento de Gestión de Casos e interpretación de resultados, Sección de Genética Forense).

7.5.4.2.4 Prepare una mezcla homogénea que incluya el master mix y los primers siguiendo las indicaciones estipuladas para cada procedimiento por la casa comercial. (ver panfleto de cada kit comercial).

7.5.4.2.5 Realice el montaje de las reacciones de amplificación para cada una de las diluciones de la siguiente manera de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial para cada procedimiento. (ver panfleto de cada kit comercial).

7.5.4.2.6 Agregue la cantidad de ADN necesaria para obtener la cantidad en ng requerida de acuerdo a la tabla anterior.

7.5.4.2.7 Realice el montaje de al menos 10 controles negativos y 10 controles blanco de reacción para la determinación del umbral analítico del kit.

7.5.4.2.8 Utilice la cantidad de ciclos de amplificación recomendados por la validación realizada por la casa comercial. (ver panfleto de cada kit comercial).

7.5.4.2.8.1 Para preparar las muestras se deberán utilizar pipetas previamente verificadas y que cumplan el porcentaje de variación estipulado para la realización del procedimiento. (Pon de Gestión de Casos e Interpretación de resultados) y/o los equipos de pipeteo automatizado previamente verificados.

7.5.4.2.9 Compruebe el resultado mediante la obtención de perfiles genéticos que cumplan los criterios de calidad definidos por la Sección de Genética Forense. (ver Pon de Gestión de Casos e Interpretación de resultados).

7.5.4.3 Cálculo del límite de detección, umbral analítico y umbral estocástico:

7.5.4.3.1 Utilice los resultados obtenidos en 7.5.4.2.6 y tabulados.

7.5.4.3.2 Calcule el limite de detección utilizando al menos la hoja de cálculo designada para esto.

7.5.4.3.3 Calcule el Umbral Estocástico utilizando al menos la hoja de cálculo designada para esto.

7.5.4.3.4 Calcule el Umbral Analítico utilizando al menos la hoja de cálculo designada para esto.

7.5.4.4 Estudio de verificación de mezclas:

7.5.4.4.1 Perfiles mezcla de al menos dos contribuyentes

7.5.4.4.1.1 Prepare las mezclas simuladas utilizando sangre total de personal externo a la Sección, bajo las siguientes proporciones:

COPIA NO CONTROLADA

	Donador 1 (ul)	Donador 2 (ul)	Volumen final (ul)	Proporción
1	19	1	20	20:1
2	18	2	20	10:1
3	30	6	36	5:1
4	14	7	21	2:1
5	10	10	20	1:
6	7	14	21	1:2
7	6	30	36	1:5
8	2	18	20	1:10
9	1	19	20	1:20

Donador 1 es femenino.
Donador 2 es masculino.

7.5.4.4.1.2 De ser posible, realice un recuento de leucocitos a las muestras utilizadas para realizar las proporciones con el fin de evitar resultados alterados por cantidad de células disponibles.

7.5.4.4.1.3 Coloque las muestras en las tarjetas FTA respectivas y deje secar por al menos 24hrs. (ver PON para el manejo de aplicadores, manchas de sangre y otros).

7.5.4.4.1.4 Entregue las muestras preparadas por lo menos al 50% de los analistas encargados de realizar pruebas de ADN en la Sección de Genética Forense y solicite a los mismos realizar el montaje de las muestras de forma rutinaria (con el protocolo establecido en el punto anterior) y que envíen los electroferogramas obtenidos al Encargado de Calidad de la Sección de Genética Forense o a la persona definida por la Jefatura de Sección, para el análisis respectivo.

7.5.4.4.1.5 Tabule como Encargado de Calidad de la Sección de Genética Forense o como la persona definida por la Jefatura de Sección, los resultados obtenidos y determine la proporción mínima en que la metodología utilizada permite:

- Obtener ambos perfiles genéticos que cumplan los criterios de calidad de la Sección de Genética Forense (ver Procedimiento de Gestión de Casos e interpretación de resultados, Sección de Genética Forense).
- Obtener un perfil genético mayoritario claro que cumplan los criterios de calidad de la Sección de Genética Forense (ver Procedimiento de Gestión de Casos e interpretación de resultados, Sección de Genética Forense).
- Proporción en la cuál se tiene pérdida del perfil minoritario.

7.5.4.4.1.6 Complete y firme el respectivo informe de validación y remita los resultados al Encargado de Calidad de la Sección con el fin de respaldar los registros respectivos en la carpeta del proceso de validación respectiva.

7.5.4.4.2 Perfiles mezcla de al menos tres contribuyentes

COPIA NO CONTROLADA

7.5.4.4.2.1 Prepare dos series de mezclas simuladas utilizando sangre total de personal externo a la Sección, simulando dos escenarios diferentes, bajo las siguientes proporciones:

Escenario 1	Donador 1	Donador 2	Donador 3
1:1:1	**100ul**	**100ul**	**100ul**
2:1:1	**200ul**	**100ul**	**100ul**
2:2:1	**200ul**	**200ul**	**100ul**
3:1:1	**300ul**	**100ul**	**100ul**
5:1:1	**250ul**	**50ul**	**50ul**
5:2:1	**250ul**	**100ul**	**50ul**
7:1:1	**350ul**	**50ul**	**50ul**
7:3:1	**350ul**	**150ul**	**50ul**
10:5:1	**500ul**	**250ul**	**50ul**
10:1:1	**500ul**	**50ul**	**50ul**

COPIA NO CONTROLADA

Escenario 1: Delito Sexual, 2 masculinos y una femenina.

Escenario 2	**Donador 1**	**Donador 2**	**Donador 3**
1:1:1	100ul	100ul	100ul
2:1:1	200ul	100ul	100ul
2:2:1	200ul	200ul	100ul
3:1:1	300ul	100ul	100ul
5:1:1	250ul	50ul	50ul
5:2:1	250ul	100ul	50ul

7:1:1	350ul	50ul	50ul
7:3:1	350ul	150ul	50ul
10:5:1	500ul	250ul	50ul
10:1:1	500ul	50ul	50ul

-Escenario 2: Robo/homicidio/hurtos/lesiones/otros, 3 masculinos.

7.5.4.4.2.2 De ser posible, realice un recuento de leucocitos a las muestras utilizadas para realizar las proporciones con el fin de evitar resultados alterados por cantidad de células disponibles.

7.5.4.4.2.3 Por cada proporción realice tres tipos distintos de manchas, simulando a su vez distintos escenarios de posible creación de la mancha:

- Mancha A: mancha de lo más concentrado a lo menos, agregue el volumen mayor de sangre total en el FTA, deje secar y agregue encima el siguiente volumen, deje secar y por último el volumen menor.
- Mancha B: mancha de lo menos a lo más concentrado, agregue el volumen menor de sangre total en el FTA, deje secar y agregue encima el siguiente volumen, deje secar y por último el volumen mayor.
- Mancha C: mancha hecha con mezcla de los diversos volúmenes de sangre total, agregue todos los volúmenes de sangre total a un tubo eppendorf, homogenice y coloque esta mezcla en la tarjeta FTA.

7.5.4.4.2.4 Coloque las muestras en las tarjetas FTA respectivas y deje secar por al menos 24hrs. (Ver PON para el manejo de aplicadores, manchas de sangre y otros).

7.5.4.4.2.5 Una vez secas las tarjetas, realice un recorte de la mancha (por triplicado).

7.5.4.4.2.6 Realice el proceso de extracción y cuantificación de ADN (Ver PON para la cuantificación de ADN utilizando el termociclador por tiempo real ABI7500).

7.5.4.4.2.7 Realice el proceso de amplificación de marcadores, normalizando los extractos a 0.8 ng de ADN total. (ver PON de Amplificación de Marcadores Genéticos por la reacción en cadena de la polimerasa).

7.5.4.4.2.8 Realice el proceso de electroforesis capilar en los analizadores genéticos. (ver PON para el Uso y Manejo del Analizador Genético ABI3500).

7.5.4.4.2.9 Tabule, como Encargado de Calidad de la Sección de Genética Forense o como la persona definida por la Jefatura de Sección, los resultados obtenidos y determine:

- el número total de alelos obtenidos.

COPIA NO CONTROLADA

- la presencia de los perfiles conocidos.
- la presencia de drop in, drop out o artefactos constantes.
- las posibles proporciones determinadas por el software ArmedXpert.
- en la medida de lo posible para el escenario 1, use el perfil de la ofendida como referencia.

7.5.4.4.2.10 Complete y firme el respectivo informe de validación y remita los resultados al Encargado de Calidad de la Sección con el fin de respaldar los registros respectivos en la carpeta del proceso de validación respectiva.

7.6 Decisión de validación:

Valore los resultados de la validación con los criterios de aceptación establecidos en el plan de validación respectivo.

Complete el Formulario: Informe de Validación.

Solicite la revisión de dicha validación al líder técnico o a otro funcionario(a) competente según lo indicado por la Jefatura de Sección. De esto se deja constancia en el Formulario Informe de Validación. La revisión idealmente se debe realizar por la misma persona que revisó el plan de validación.

Una vez revisado el informe de validación, remita a revisión y aprobación de la Jefatura de Sección.

Como Jefe de Sección declare la conformidad del método y la aprobación de la validación respectiva (punto 5. Formulario: Informe de validación).

COPIA NO CONTROLADA

7.7 Gráficos de control:

Utilice gráficos de control para monitorear el desempeño de la metodología validada (monitoree los parámetros que se considere críticos para la metodología validada).

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Los criterios de aceptación y rechazo dependerán de la metodología particular a validar y serán establecidos en el plan de validación y en el Formulario "Informe de validación de Métodos".	Los valores límites dependerán de la metodología particular	Las acciones correctivas dependerán de la metodología particular a validar y serán establecidas en el apartado 2.1 del Formulario "Informe de Validación de Métodos".

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

Para los cálculos relacionados con la validación Utilice la Hoja de Cálculo de Validación. Para el cálculo de incertidumbres se debe seguir lo indicado en el Procedimiento para la Estimación de Incertidumbres de los Análisis Forenses.

10 Reporte de Análisis y Resultados:

Registre los resultados en el Formulario "Informe de Validación de Métodos".

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

N/A

12 Simbología:

abs: valor absoluto

ADN: ácido desoxiribonucléico o se refiere a la técnica analítica mediante la cual se realiza su determinación.

Anova: análisis de varianza

b: intercepto de una línea recta

DCF: Departamento de Ciencias Forenses

DE: desviación estándar

COPIA NO CONTROLADA

EPA: Environmental Protection Agency

F: simbología para la prueba estadística F, cociente de dos varianzas

G: simbología para la prueba estadística de Cochran

GLR: grados de libertad residuales

LC: límite de cuatificación

LD: límite de detección

LDI: límite de detección instrumental

m: pendiente de una línea recta

MRC: Material de referencia certificado

n: número de muestras

N/A: No aplica

OSAC: Organization of Scientific Area Committeess for Forensic Science (Organización de Comités Científicos de Área para las Ciencias Forenses)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PON: Procedimiento de Operación Normado

RFUs: unidades relativas de fluorescencia

s_b: desviación estándar del intercepto

sB: desviación estándar de la señal de un blanco

s_m: desviación estándar de la pendiente

sR: señal del ruido

R: Función de respuesta, Respuesta o Función Optimización

Refi: Razón de Eficiencia

REsp: Razón de Especificidad

RFN: Razón de Falsos Negativos

RFP: Razón de Falsos Positivos

Rsel/Sen: Razón de Selectividad/sensibilidad

COPIA NO CONTROLADA

r: coeficiente de regresión lineal

r2: coeficiente de determinación

SCD: solicitud de cambio documental

SGC: Sistema de Gestión de Calidad

UA: umbral analítico

UGC: Unidad de Gestión de Calidad

VLP: valor promedio reportado para los laboratorios participantes

x: simbología para las abscisas

y: simbología para las ordenadas

COPIA NO CONTROLADA

13 Terminología:

- Analito: Una sustancia química definida y de estructura química conocida que puede ser un compuesto, un derivado conjugado, un metabolito o un producto de degradación.

- Calibración: Conjunto de operaciones que permiten establecer, en condiciones específicas, la relación existente entre los valores indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida, o los valores representados por una medida materializada o un material de referencia, y los valores correspondientes a una magnitud obtenidos mediante un patrón de referencia.

- Eficiencia de la recuperación: La eficiencia de la extracción de una metodología analítica, representada como el porcentaje de una cantidad de un analito, que es recuperada a través de un proceso de extracción de una matriz y de los pasos de procesamiento de un análisis. Este parámetro aplica para análisis cualitativos y es especialmente necesario en análisis cuantitativos.

- Exactitud: es la concordancia entre el valor de la medida materializada y el valor verdadero, por una combinación de alta veracidad (mínimo error o sesgo) y alta precisión (mínimo error aleatorio o máxima repetibilidad).

- Homocedasticidad u homogeneidad de varianzas: Condición de un método analítico en el cual las varianzas de la señal analítica a diferentes niveles de concentración, no difieren significativamente. La comprobación se realiza a través de pruebas estadísticas específicas como las de Cochran, Barlett y Levene, entre otras. La condición de varianzas estadísticamente diferentes se denomina heterocedasticidad.

- Intervalo de trabajo: Es el intervalo de concentración en el que puede obtenerse una veracidad y precisión adecuadas al objetivo del método y depende del alcance de la metodología de análisis y del tipo de muestras con que se quiere trabajar. El intervalo de linealidad debe escogerse dentro del ámbito en el que la linealidad de un instrumento

se ha demostrado. También se ha definido como la diferencia entre la mayor y menor concentración del analito que puede determinarse satisfactoriamente con adecuada (de acuerdo a los requerimientos del método específico) linealidad, veracidad y precisión.

- Límite de cuantificación: El valor de concentración mínima que puede determinarse cuantitativamente con un nivel aceptable de veracidad y precisión. Se establece examinando una muestra o material de referencia apropiado. Aplicado a análisis microbiológicos cuantitativos, se define como el número mínimo de microorganismos dentro de una variabilidad definida que puede determinarse en las condiciones experimentales del método evaluado. También es denominado como umbral de cuantificación.

- Límite de detección: Es la mínima cantidad (concentración) de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Suele relacionarse con la concentración que da una señal equivalente a la respuesta de un blanco más tres desviaciones estándar. Aplicado a análisis microbiológicos cualitativos se define como el número mínimo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en cantidades que no pueden estimarse con precisión. En el caso de la determinación de perfiles genéticos por medio de técnicas moleculares, corresponde al valor de en RFUs (unidades relativas de fluorescencia) que genera la confianza suficiente para asegurar que cualquier pico igual o superior a este valor es realmente un amplicón de PCF. Es también denominado como umbral de detección.

- Límite de linealidad: Es la cantidad de ADN, amplificado bajo condiciones específicas y analizado utilizando parámetros específicos de inyección, que presenta una saturación del detector del analizador genético de tal modo que un aumento en la cantidad de ADN no desencadena un aumento lineal en la señal.

- Linealidad / función respuesta: Es la habilidad de un instrumento para responder en su señal de manera proporcional a la concentración de un analito en la disolución o a la cantidad de materia del analito presente en la celda, columna, llama, fuente de plasma o cualquier otro compartimiento de análisis. Se refiere fundamentalmente a los métodos instrumentales. Comúnmente se denomina curva patrón o curva de calibración y no es imprescindible que exista un rango lineal para que el método sea eficaz. Cuando no sea posible la linealidad para un método, se deberá encontrar un algoritmo adecuado. Dicho de otra manera, la linealidad es la capacidad de un método para proporcionar resultados directamente (o por medio de transformaciones matemáticas) proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un rango establecido de concentraciones.

- Material de referencia: Material o sustancia (gas, líquido, sólido, puro o compuesto) en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y están bien definidos para permitir utilizarlos para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición o la asignación de valores a los materiales.

- Material de referencia certificado: Material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad con una relación exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad y para la cual cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación de un nivel de confianza.

COPIA NO CONTROLADA

- Matriz: en una muestra a analizar, se define como matriz todos los componentes de la misma, distintos de él o los analitos de interés.

- Método de referencia: Método investigado a fondo, que describe con claridad las condiciones y los procedimientos necesarios para medir los valores de una o más propiedades y que ha demostrado tener una exactitud apropiadas para el uso que pretende hacerse del mismo.

- Patrón: Medida materializada, instrumento de medida, material de referencia o sistema de medida destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o varios valores de una magnitud para que sirvan de referencia.

- Precisión: El grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento experimental repetidas veces bajo las condiciones establecidas sobre la misma muestra homogénea. Depende sólo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado. Se expresa en términos de imprecisión y se calcula como la desviación estándar de los resultados de las mediciones. Una menor precisión se refleja por una mayor desviación estándar. Es un indicador de la dispersión entre los datos y se relaciona con los errores aleatorios.

- Precisión intermedia: se refiere a las variaciones en un mismo laboratorio pero en diferentes días y diferentes analistas.

- Pruebas con umbral: Son métodos de análisis cualitativos instrumentales (test screennig) que basan su resultado binario (si/no) en función de un nivel de concentración mínimo establecido que marca el final de la zona de correctos negativos, permitiendo asegurar la ausencia de falsos negativos. Los falsos positivos se evalúan posteriormente con una prueba confirmatoria.

- Rango dinámico (para ADN): Se encuentra definido como el rango comprendido entre el límite de detección en el extremo inferior del rango del analizador genético y el límite de linealidad en el extremo superior. Ver definición de límite de linealidad.

- Repetibilidad: Precisión de los resultados de una medición obtenidos con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un intervalo de tiempo corto (el mismo día).

- Repeticiones: Varias lecturas instrumentales para una sola preparación.

- Réplica: Cada uno de los tratamientos o preparaciones que se realizan con una misma metodología; pero que son realizados de forma independiente.

- Reproducibilidad: Precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición u observación se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mensurando, con diferentes operadores, diferentes equipos de medida, en diferentes laboratorios, etc.

- Revalidación: verificación mediante pruebas documentadas de que un método analítico previamente validado, continúa siendo suficientemente confiable en el tiempo o tras realizar modificaciones respecto al método inicial. La revalidación viene determinada por el criterio, experiencia y conocimiento del método del personal responsable, siendo fundamental que esté justificada y documentada adecuadamente (los gráficos de control

COPIA NO CONTROLADA

permiten evaluar el método en el tiempo lo cual es una herramienta para determinar la necesidad de revalidación de una metodología).

- Robustez: Son los resultados no afectados por pequeñas, aunque deliberadas variaciones en los parámetros del método como pueden ser la luz, la temperatura, las lentes, entre otros. Medición de los efectos para un analito bajo una variedad de condiciones analíticas, tales como modificación de la matriz, las condiciones de almacenamiento, etc., para recuperar el analito o medir una concentración específica de un analito. Este parámetro permite establecer si un parámetro del método es afectado significativamente por cambios controlados en las condiciones de operación. Los factores que son determinados como críticos habrán de ser controlados estrictamente.

- Selectividad y especificidad: capacidad de un método de determinar un analito específico dentro de una muestra, sin ser interferido por: compuestos relacionados, por sus metabolitos, por productos de degradación (por ejemplo diazepam entre otras benzodiacepinas y metabolitos), por componentes de la muestra o por los componentes que se adicionan con el método. La selectividad es la capacidad del método de analizar las diferentes matrices y la especificidad es la capacidad del método de detectar sólo el/los parámetro/s de interés.

- Sensibilidad: Capacidad de un método analítico para detectar pequeñas concentraciones de analito. Para ADN se define como el contenido más bajo de ADN que puede ser medido con una certeza estadística razonable (7.1, 7.13).

- Stutter: Extrabandas producidas por el deslizamiento o "slippage" de la polimerasa durante el proceso de amplificación. También conocido como bandas de repetición.

- Trazabilidad: Propiedad del resultado de una medición o de un patrón tal que pueda relacionarse, con referencias determinadas generalmente a patrones nacionales o internacionales por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas las incertidumbres determinadas.

- Umbral estocástico: La cantidad de ADN amplificado por debajo del cual los alelos de un locus o entre loci presentan desbalance.

- Validación: Es la confirmación, mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto de la metodología. Esta confirmación se realiza para métodos de análisis/inspección desarrollados en el DCF. Esto implica generar una base documental directa que, para efectos de este PON corresponde al ampo Registro de "Validación de métodos de análisis forenses".

- Valor verdadero: Valor que se asigna a una muestra de concentración conocida.

- Veracidad: es el grado de concordancia entre el resultado de la medición u observación y el valor de referencia aceptado como verdadero para un estándar internacional, nacional, institucional o del propio laboratorio. La veracidad está relacionada inversamente con el error sistemático (sea instrumental, metodológico o del analista).

- Verificación: Confirmación de la competencia por la correspondencia de requisitos establecidos, los cuales están documentados como aporte de prueba objetiva. La misma

COPIA NO CONTROLADA

se realiza para el caso de métodos normalizados, métodos no normalizados, métodos normalizados modificados o métodos utilizados fuera del alcance previsto.

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Selección de parámetros de revalidación
2	Prueba t y Prueba F
3	Prueba estadística de Cochran
4	Estimación del límite de detección a partir del ruido por la relación señal/ruido
5	Representación gráfica de la estimación del límite de detección a partir del corredor de error superior de la curva de calibración
6	Desarrollo del diseño factorial completo.
7	Chi-cuadrado y evaluación de los parámetros de validación en métodos de análisis cualitativos
8	Ejemplo para la obtención de parámetros para la valoración del grado de certeza en las pruebas interpretativas
9	Estadísticos para evaluar resultados de las pruebas interlaboratoriales
10	Razones cualitativos
11	Wilcoxon
12	Wilcoxon reproducibilidad ejemplo parejas balísticas

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 01

Selección de parámetros de revalidación

Cuadro A1.1: Parámetros de desempeño mínimos a revalidar cuando se da una modificación de un método ya validado

Modificación	Parámetros de desempeño mínimos a revalidar
Método de extracción	Selectividad, veracidad y recuperación.
Matriz de la muestra	Selectividad, veracidad (cuando aplique incluir la recuperación), precisión, linealidad (solo cuando se determina en presencia de matriz), límite de detección, límite de cuantificación.
Cambio en la preparación de la muestra	Selectividad, linealidad, exactitud, límite de detección y cuantificación (si procede)
Extensión del ámbito	Linealidad, precisión
Cambios en condiciones experimentales	Robustez
Sistema de detección	Selectividad, linealidad, precisión, límite de detección y de cuantificación (si procede)
Cambio de patrones, equipos o reactivos	Exactitud (veracidad y precisión), y cuando aplique: límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, selectividad
Cambio de condiciones operacionales que puedan afectar significativamente al método (e.g. cambio de tipo de columna cromatográfica)	Selectividad, exactitud, linealidad, límites de detección y de cuantificación (si procede)
Personal nuevo (ver nota No. 21)	Veracidad, repetibilidad, grado de certeza (para pruebas interpretativas y cualitativas)

Nota No. 20: Cuando se hayan presentado modificaciones relevantes en el método y/o cuando se detecten parámetros fuera de control o una tendencia en los resultados obtenidos para los mismos proceda a valorar la validación vigente con el fin de ver la necesidad de realizar una revalidación.

Nota No 21: se debe verificar que no exista diferencia significativa de los valores obtenidos con los valores de validación del método con la prueba t y la prueba F. De existir diferencia se deberá plantear acciones correctivas como por ejemplo la capacitación del personal. De no existir diferencias se acepta que la persona pueda realizar análisis que cumplen con los parámetros de validación del método.

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 02

Prueba t-Student

Comparación de una media experimental con un error conocido: para decidir si la diferencia entre la media muestral ($\bar{y}$) y el valor verdadero (μ) es significativa, esto a partir de un estadístico t que se calcula de la siguiente manera:

$$t = (\bar{y}-\mu)\sqrt{n}/s.$$

Si $|t|$ es mayor que un cierto valor crítico entonces se rechaza la hipótesis nula (H_o), es decir la diferencia es significativa.

Comparación de dos medias experimentales ($\bar{y}$): para contrastar los resultados de un método analítico nuevo ($\bar{y}_1$) con un segundo método ($\bar{y}_2$), tomando como hipótesis nula que los dos métodos proporcionen el mismo resultado, es decir H_0: $\mu_1 = \mu_2$. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, varianza homogénea ($\sigma^2_1=\sigma^2_2$), se puede hacer una estimación conjunta del estadístico t a partir de las desviaciones estándar individuales s_1 y s_2.

$$t = (\bar{y}_1 - \bar{y}_2)/s\sqrt{(1/n_1 - 1/n_2)} \quad (7.17)$$

donde s se calcula a partir de

$$s^2 = (n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2/(n_1 + n_2 -2). \quad (7.17)$$

y t tiene $n_1 + n_2$ -2 grados de libertad.

Cuando sea poco probable que las desviaciones estándar de las poblaciones sean iguales, varianza heterogénea ($\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$), el estadístico t se calcula a partir de

$$t = (\bar{y}_1 - \bar{y}_2)/\sqrt{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)}$$

con grados de libertad = $(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2/((s_1^4/n_1^2(n_1 - 1)) + (s_2^4/n_2^2(n_2 - 1)).$ (7.17)

Si $|t| <$ t crítico → la diferencia no es significativa.

Si $|t| >$ t crítico → la diferencia es significativa.

El contraste t para datos emparejados: en el caso en que se desee comparar dos métodos de análisis en que las muestras de ensayo contengan sustancialmente cantidades diferentes de analito, observando la diferencia (d) entre cada par de resultados por los dos métodos. Para probar la hipótesis nula se prueba si la media de la diferencia difiere significativamente de cero utilizando un t estadístico.

$$t = \bar{d}\sqrt{n}/s_{d.}$$

COPIA NO CONTROLADA

donde đ y s_d son respectivamente la media y la desviación estándar de d, la diferencia entre los valores que forman cada par. El número de grados de libertad de t es n – 1.
Contraste de una y dos colas: En muchas situaciones el analista no tiene una idea previa a las mediciones experimentales, en cuanto a si la diferencia entre la media experimental y el valor de referencia será positiva o negativa, de manera que el contraste utilizado deberá cubrir cualquier posibilidad, en este caso se denomina de dos colas (o bilateral). En el caso especial en que se desee estimar el contraste de una cola, la probabilidad será el doble de la probabilidad que es relevante en el constraste bilateral. (7.17)

Cuadro A.2.1 Valores críticos de t de Student. Áreas de cola bilateral en función de los grados de libertad (ν).

	α						
(ν)	0.50	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002
1	1.000	3.078	6.314	12.706	31.821	63.656	318.289
2	0.816	1.886	2.290	4.303	6.965	9.925	22.328
3	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.214
4	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173
5	0.727	1.467	2.015	2.571	3.365	4.032	5.894
6	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208
7	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785
8	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501
9	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297
10	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144
11	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025
12	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930
13	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852
14	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787
15	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.773
16	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686
17	0.689	1.333	1.740	2.110	2.569	2.898	3.646
18	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.874	3.610
19	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579
20	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552
21	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527
22	0.685	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505
23	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485
24	0.684	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467
25	0.684	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.450
26	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435
27	0.683	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.421
28	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408
29	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396
30	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385
40	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307
50	0.679	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.261
60	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232
70	0.678	1.294	1.667	1.994	2.381	2.648	3.211
∞	0.675	1.282	1.645	1.969	2.326	2.576	3.090

COPIA NO CONTROLADA

Distribución F-Snedecor: Contraste para comparar desviaciones estándar de dos conjuntos de datos. Para probar si es significativa la diferencia entre dos varianzas muestrales (H_0 : $\sigma^2_1=\sigma^2_2$), se calcula la distribución F de la siguiente manera:

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

Donde 1 y 2 se disponen en la ecuación de modo que F sea siempre ≥ 1. El número de grados de libertad del numerador y denominador son n_1 -1 y n_2 -2 respectivamente. Si el valor calculado de F supera un cierto valor crítico entonces la diferencia entre las dos varianzas muestrales es significativa.

Cuadro A.2.2 Valores críticos de distribución F de Snedecor, para un contraste de dos colas (p = 0,05) con función de los grados de libertad

ν_1 / ν_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.7	963.3	968.6	976.7	984.9
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40	39.41	39.43
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42	14.34	14.25
4	12.22	10.65	9.979	9.605	9.364	9.197	9.074	8.980	8.905	8.844	8.751	8.657
5	10.01	8.434	7.764	7.388	7.146	6.978	6.853	6.757	6.681	6.619	6.525	6.428
6	8.813	7.260	6.599	6.227	5.988	5.820	5.695	5.600	5.523	5.461	5.366	5.269
7	8.073	6.542	5.890	5.523	5.285	5.119	4.995	4.899	4.823	4.761	4.666	4.568
8	7.571	6.059	5.416	5.053	4.817	4.652	4.529	4.433	4.357	4.295	4.200	4.101
9	7.209	5.715	5.078	4.718	4.484	4.320	4.197	4.102	4.026	3.964	3.868	3.769
10	6.937	5.456	4.826	4.468	4.236	4.072	3.950	3.855	3.779	3.717	3.621	3.522
11	6.724	5.256	4.630	4.275	4.044	3.881	3.759	3.664	3.588	3.526	3.430	3.330
12	6.554	5.096	4.474	4.121	3.891	3.728	3.607	3.512	3.436	3.374	3.277	3.177
13	6.414	4.965	4.347	3.996	3.767	3.604	3.483	3.388	3.312	3.250	3.153	3.053
14	6.298	4.857	4.242	3.892	3.663	3.501	3.380	3.285	3.209	3.147	3.050	2.949
15	6.200	4.765	4.153	3.804	3.576	3.415	3.293	3.199	3.123	3.060	2.963	2.862
16	6.115	4.687	4.077	3.729	3.502	3.341	3.219	3.125	3.049	2.986	2.889	2.788
17	6.042	4.619	4.011	3.665	3.438	3.277	3.156	3.061	2.985	2.922	2.825	2.723
18	5.978	4.560	3.954	3.608	3.382	3.221	3.100	3.005	2.929	2.866	2.769	2.667
19	5.922	4.508	3.903	3.559	3.333	3.172	3.051	2.956	2.880	2.817	2.720	2.617
20	5.871	4.461	3.859	3.515	3.289	3.128	3.007	2.913	2.837	2.774	2.676	2.573

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 03

Ejemplo prueba de Cochran

La prueba de homogeneidad de varianzas propuesta por Cochran utiliza el siguiente estadístico de prueba:

$$G_{exp} = \frac{s^2\,máxima}{\sum S_i{}^2} = \frac{s^2\ máxima}{s_1^2+s_2^2+s_3^2+s_4^2+s_5^2}$$

Permite verificar cuando todas las muestras son de igual tamaño $n = n_1 = n_2 = \ldots = n_k$, la hipótesis acerca de la homogeneidad de varianzas es rechazada si $G_{exp} > G_{\alpha,n,k}$, donde el valor $G_{\alpha,n,k,} = G_{tablas}$, se obtiene de la tabla de valores críticos la prueba de Cochran para en tablas especiales. Cuando el número de observaciones en cada tratamiento no sea igual pero sea relativamente cercano, el mayor de los n_i puede usarse en lugar de n para determinar los grados de libertad requeridos en las tablas. La prueba de Cochran es muy útil y el resultado de la misma indicará, si el factor concentración tienen alguna influencia en la variabilidad de los resultados.

Ejemplo 1:

Cuadro A.3.1: Ejemplo de prueba de Cochran

Concentración (mg/L)	Respuesta Instrumental	Promedio	Variancia (s^2)
80	6440,0	6438,1	15,57
80	6433,6		
80	6440,8		
90	7245,0	7242,9	19,71
90	7237,8		
90	7245,9		
100	8066,0	8077,33	217,33
100	8094,0		
100	8072,0		
110	8859,4	8859,4	1398,76
110	8896,8		
110	8822,0		
120	9699,6	9663,2	1037,28
120	9651,6		
120	9638,4		

$$G_{exp} = \frac{1398,76}{15,57+19,71+217,33+1398,98+1037,28}$$

$G_{exp} = 0,5202$

COPIA NO CONTROLADA

G_{tablas} = (α = 0,05, k=5, n-1=2) = 0,6838
G_{exp} < G_{tablas}, significa que las varianzas son homogéneas (homocedasticidad). En caso contrario, se rechaza la hipótesis nula y se establece la condición de varianzas heterogéneas (heterocedasticidad).

Ejemplo 2:

Cuadro A.3.2: Ejemplo de prueba de Cochran

Concentración (mg/L)	Respuesta Instrumental	Dev. Estandar	Variancia (s^2)
0,05	0,00183	0,00006	0,000000004
0,85	0,04700	0,0008	0,0000006
1,65	0,115	0,006	0,00004
2,45	0,182	0,004	0,00002
3,25	0,254	0,007	0,00005
4,00	0,322	0,002	0,000004
5,00	0,390	0,01	0,0001

COPIA NO CONTROLADA

$$G_{exp} = \frac{0,0001}{0,000000004 + 0,0000006 + 0,00004 + 0,00002 + 0,00005 + 0,000004 + 0,0001}$$

G_{exp} = 0,4863

G_{tablas} = (α = 0,05, k=7, n-1=4) = 0,4307

G_{exp} > G_{tablas}, Se rechaza la hipotesis nula y se establece la condición de varianzas heterogéneas (heterocedasticidad).

Cuadro A.3.3 Valores críticos para la prueba de Cochran al nivel de significancia de p = 0,01.

Grados de libertad (v = n − 1)
Nº de grupos (k)

Nivel de significacia α = 0.01														
	$\nu_x = n-1$													
k	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	144	∞
2	0.9999	0.9950	0.9794	0.9586	0.9373	0.9172	0.8988	0.8823	0.8674	0.8539	0.7949	0.7067	0.6062	0.5000
3	0.9933	0.9423	0.8831	0.8335	0.7933	0.7606	0.7335	0.7107	0.6912	0.6743	0.6059	0.5153	0.4230	0.3333
4	0.9676	0.8643	0.7814	0.7212	0.6761	0.6410	0.6129	0.5897	0.5702	0.5536	0.4884	0.4057	0.3251	0.2500
5	0.9279	0.7885	0.6957	0.6329	0.5875	0.5531	0.5259	0.5037	0.4854	0.4697	0.4094	0.3351	0.2644	0.2000
6	0.8828	0.7218	0.6258	0.5635	0.5195	0.4866	0.4608	0.4401	0.4229	0.4084	0.3529	0.2858	0.2229	0.1667
7	0.8376	0.6644	0.5685	0.5080	0.4659	0.4347	0.4105	0.3911	0.3751	0.3616	0.3105	0.2494	0.1929	0.1429
8	0.7945	0.6152	0.5209	0.4627	0.4226	0.3932	0.3704	0.3522	0.3373	0.3248	0.2779	0.2214	0.1700	0.1250
9	0.7544	0.5727	0.4810	0.4251	0.3870	0.3592	0.3378	0.3207	0.3067	0.2950	0.2514	0.1992	0.1521	0.1111
10	0.7175	0.5358	0.4469	0.3934	0.3572	0.3308	0.3106	0.2945	0.2813	0.2704	0.2297	0.1811	0.1376	0.1000
11	0.6528	0.4751	0.3919	0.3428	0.3099	0.2861	0.2680	0.2535	0.2419	0.2320	0.1961	0.1535	0.1157	0.0833
12	0.5747	0.4069	0.3317	0.2882	0.2593	0.2386	0.2228	0.2104	0.2002	0.1918	0.1612	0.1251	0.0934	0.0667
15	0.4799	0.3297	0.2654	0.2288	0.2048	0.1877	0.1748	0.1646	0.1567	0.1501	0.1248	0.0960	0.0709	0.0500
20	0.4247	0.2871	0.2295	0.1970	0.1759	0.1608	0.1495	0.1406	0.1338	0.1283	0.1060	0.0810	0.0595	0.0417
30	0.3632	0.2412	0.1913	0.1635	0.1454	0.1327	0.1232	0.1157	0.1100	0.1054	0.0867	0.0658	0.0480	0.0333
40	0.2940	0.1915	0.1508	0.1281	0.1135	0.1033	0.0957	0.0898	0.0853	0.0816	0.0668	0.0503	0.0363	0.0250
60	0.2151	0.1371	0.1069	0.0902	0.0796	0.0722	0.0668	0.0625	0.0594	0.0567	0.0461	0.0344	0.0245	0.0167
120	0.1225	0.0759	0.0585	0.0489	0.0429	0.0387	0.0357	0.0334	0.0316	0.0302	0.0242	0.0178	0.0125	0.0083

COPIA NO CONTROLADA

Cuadro A.3.4: Valores críticos para la prueba de Cochran al nivel de significancia de p = 0,05.

Nivel de significacia α = 0.05														
	$\nu_x = n-1$													
k	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	144	∞
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8332	0.8159	0.8010	0.7880	0.7341	0.6602	0.5813	0.5000
3	0.9669	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6530	0.6333	0.6167	0.6025	0.5466	0.4748	0.4031	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5365	0.5175	0.5017	0.4884	0.4366	0.3720	0.3093	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4564	0.4387	0.4241	0.4118	0.3645	0.3066	0.2513	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3980	0.3817	0.3682	0.3568	0.3135	0.2612	0.2119	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3535	0.3384	0.3259	0.3154	0.2756	0.2278	0.1833	0.1429
8	0.6798	0.5157	0.4377	0.3910	0.3595	0.3362	0.3185	0.3043	0.2926	0.2829	0.2462	0.2022	0.1616	0.1250
9	0.6385	0.4775	0.4027	0.3584	0.3286	0.3067	0.2901	0.2768	0.2659	0.2568	0.2226	0.1820	0.1446	0.1111
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2666	0.2541	0.2439	0.2353	0.2032	0.1655	0.1308	0.1000
11	0.5410	0.3924	0.3264	0.2880	0.2624	0.2439	0.2299	0.2187	0.2098	0.2020	0.1737	0.1403	0.1100	0.0833
12	0.4709	0.3346	0.2758	0.2419	0.2195	0.2034	0.1911	0.1815	0.1736	0.1671	0.1429	0.1144	0.0889	0.0667
15	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1501	0.1422	0.1357	0.1303	0.1108	0.0879	0.0675	0.0500
20	0.3434	0.2354	0.1907	0.1656	0.1493	0.1374	0.1286	0.1216	0.1160	0.1113	0.0942	0.0743	0.0567	0.0417
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.1061	0.1002	0.0958	0.0921	0.0771	0.0604	0.0457	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0827	0.0780	0.0745	0.0713	0.0595	0.0462	0.0347	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0583	0.0552	0.0520	0.0497	0.0411	0.0316	0.0234	0.0167
120	0.0998	0.0632	0.0495	0.0419	0.0371	0.0337	0.0312	0.0292	0.0279	0.0266	0.0218	0.0165	0.0120	0.0083

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 04

Estimación del límite de detección a partir del ruido promedio o de la relación señal/ruido.

En aquellas metodologías en la que señal del analito aparece sobre una línea base ruidosa, se puede utilizar el ruido para estimar el límite de detección. Se tienen dos posibilidades:

A.4.1 Límite de detección calculado con la desviación de la magnitud del ruido (s_R o $\|_{R}$) en un intervalo de valoración:

A partir de un espectro, cromatograma, etc. de un blanco mida el ancho del ruido (amplitud: h en la Figura 1) en diferentes puntos de la línea base (al menos diez puntos) dentro de un intervalo de valoración en la línea base (el tamaño de este intervalo define la potencia del límite de detección). Obtenga un promedio de la magnitud del ruido y la desviación estándar asociada a este ruido.

Calcule la respuesta del límite de detección la cual será igual a tres veces la desviación del ruido σ_R.

$$\text{Respuesta L.D.} = 3\sigma_R$$

Prepare u obtenga estándares a baja concentración del analito y mida la señal analítica. Defina el límite de detección como aquella concentración preparada que genere una señal que sea tres veces la desviación del ruido.

$$\text{L.D.} = Cn\ (s = 3\sigma_R)$$

A.4.2 Limite de detección definido con la relación entre la señal y la magnitud del ruido en un intervalo de valoración:

Prepare estándares de baja concentración del analito y obtenga la respuesta instrumental.

A partir de las respuestas instrumentales obtenga la magnitud del ruido dentro de un intervalo de valoración (el tamaño de este intervalo define la potencia del límite de detección). Para ello mida el ruido pico a pico (señalado como "h" en la Figura A4.1 de este Anexo). Para cromatografía el intervalo de valoración debería ser como mínimo equivalente a 20 veces el ancho del pico a la mitad de la altura, como se muestra en la Figura A4.1. La magnitud del ruido se puede medir manualmente en el cromatograma, espectro, etc. impreso o a través del autointegrador del equipo, si existe la opción instrumentalmente.

Mida la señal del analito "S" (identificada como "H" en la Figura A4.1) desde el máximo del pico hasta la línea base promedio extrapolada en el intervalo de valoración (h/2).

Determine la relación señal/ruido (S/R) para cada uno de los estándares con base en la siguiente fórmula:

$$S/R = 2H/h$$

De ser necesario use estándares de menor concentración hasta alcanzar una relación señal/ruido de 3.

COPIA NO CONTROLADA

La respuesta del límite de detección será igual a tres veces la magnitud del ruido.

Respuesta L.D. = 2H/h=3

El límite de detección será igual a la concentración que implique una señal de tres veces la magnitud del ruido dentro de la curva de calibración del método.

L.D. = Cn (S = 3R)

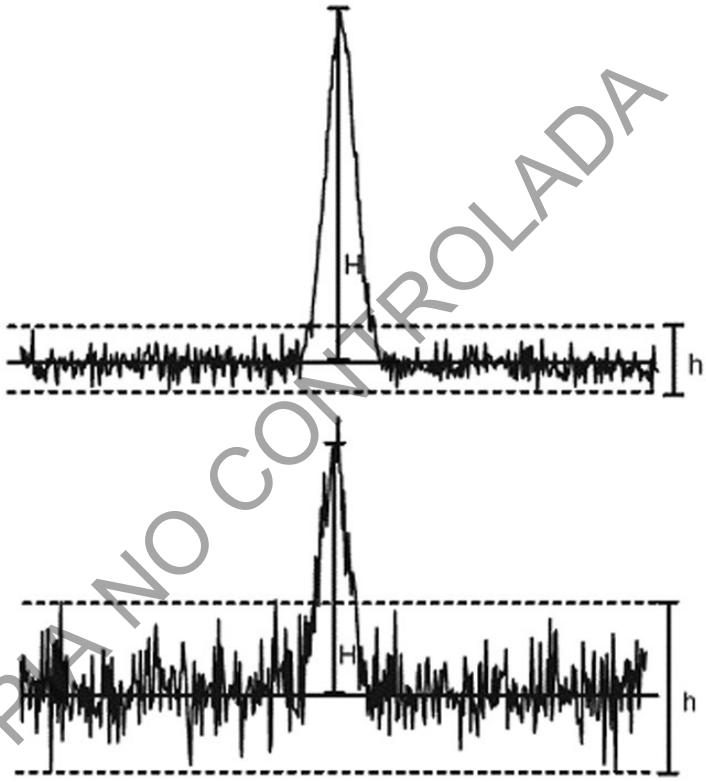


Figura A4.1. Ejemplos de relación señal/ruido de 10:1 (arriba) y 3:1 (abajo) usando el método de la Farmacopea Europea (7.31).

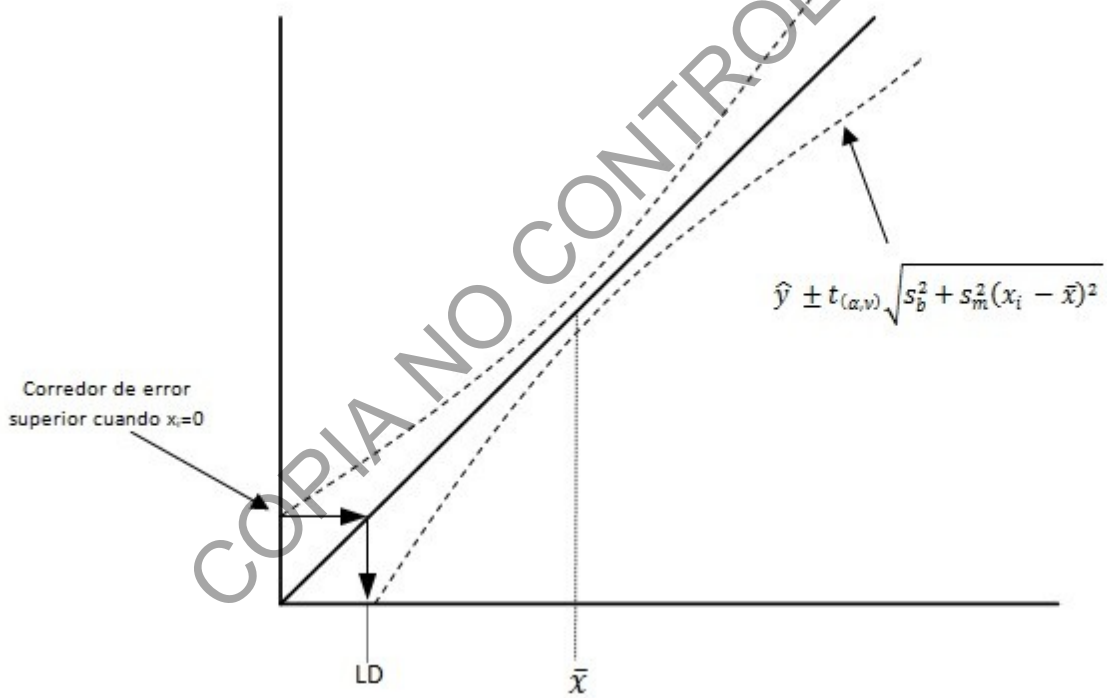
COPIA NO CONTROLADA

Anexo 05

Representación gráfica de la estimación del límite de detección a partir del corredor de error superior y del método de la desviación del intercepto de la curva de calibración.

1. Límite de detección a partir del corredor de error superior cuando intercepto es mayor a cero:

$$LD = \frac{t_{(\alpha,v)}\sqrt{s_b^2 + s_m^2 \acute{x}^2}}{m} \Rightarrow b > 0$$



COPIA NO CONTROLADA

Figura A5.1. Representación gráfica de la estimación del límite de detección a partir del corredor de error superior cuando el intercepto es mayor a cero

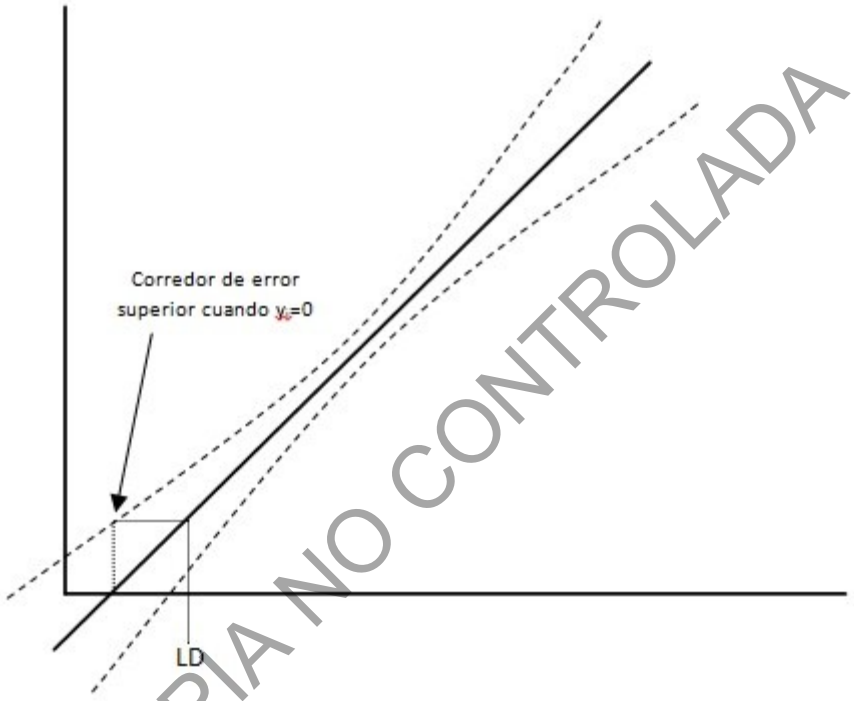
Donde:
$t_{(\alpha,v)}$ = estadístico t con una probabilidad igual a "α" y "ν" grados de libertad, s_b = desviación del intercepto

s_m = desviación de la pendiente, m = pendiente, b = intercepto y $\hat{y}$ = valor de y modelo.

-

2. Límite de detección a partir del corredor de error superior cuando intercepto es menor a cero:

$$LD = \frac{t_{(\alpha,v)}\sqrt{s_b^2 + s_m^2\left(\frac{-b}{m} - \acute{x}\right)^2} - b}{m} \Rightarrow b < 0$$



COPIA NO CONTROLADA

Figura A5.2. Representación gráfica de la estimación del límite de detección a partir del corredor de error superior cuando el intercepto es menor a cero

Donde:
$t_{(\alpha,v)}$ = estadístico t con una probabilidad igual a "α" y "ν" grados de libertad, s_b = desviación del intercepto
s_m = desviación de la pendiente, $\acute{x}$= promedio de los valores de x, m = pendiente, b = intercepto y $\hat{y}$= valor de y modelo.

3. Límite de detección método de desviación del intercepto cuando el intercepto es mayor a cero:

$$LD = 3\, s_b / m$$

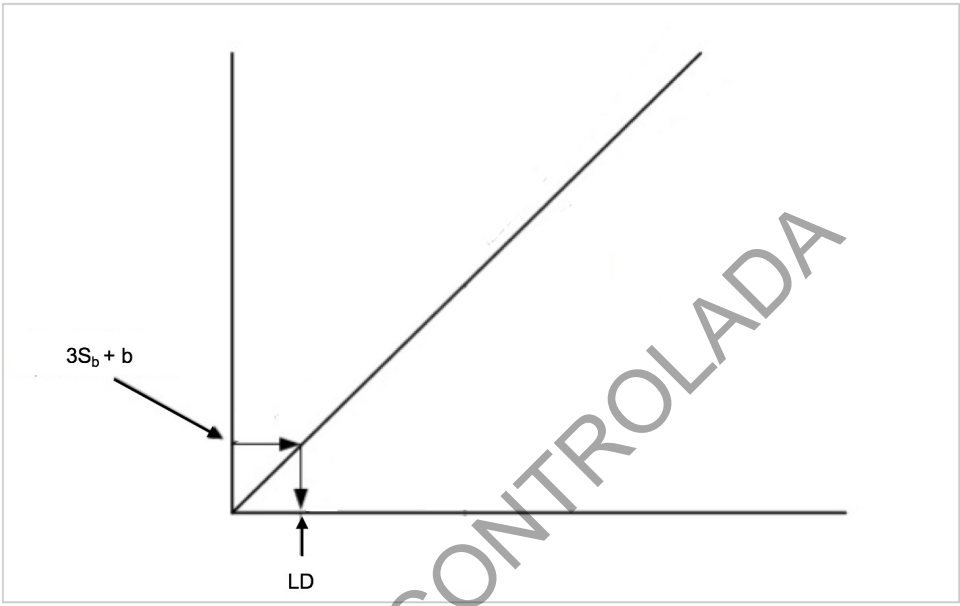


Figura A5.3. Representación gráfica de la estimación del límite de detección a partir del método de la desviación del intercepto cuando el intercepto es mayor a cero

Donde: s_b = desviación del intercepto, b = intercepto, m= pendiente

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 06

Tratamiento de datos en el análisis de robustez por medio de diseños factoriales

A) Consideraciones preliminares:

En este anexo se presenta un ejemplo del tratamiento de datos que se debe realizar con diseños experimentales factoriales en el estudio de optimización o el análisis de robustez, de acuerdo con este PON. Con relación al ejemplo presentado, tomado de la fuente indicada al final de este anexo, debe aclararse que el mismo no es una optimización de metodología analítica o prueba de ensayo, pero el tratamiento es completamente similar al que se presenta. En todo estudio de este tipo es fundamental la definición de una Función de respuesta (R), Respuesta o Función de Optimización, previo a la realización de los tratamientos o corridas experimentales. Además debe definirse si la optimización es una minimización o una maximización.

B) Definición del problema de estudio en el ejemplo de optimización (maximización versus minimización):

Una industria farmacéutica pretende optimizar la formulación de un preparado en suspensión, para minimizar la cantidad de sacudidas que deben darse al envase para lograr la suspensión total de la formulación por parte del usuario previo a su uso por vía oral.

En el laboratorio de investigación y desarrollo de la industria farmacéutica, se definió la Facilidad de resuspensión (FR), como el menor número de sacudidas que deben darse al envase para lograr la suspensión total de la formulación luego de un reposo de 15 días. Esta es la función de respuesta a optimizar (R = FR), por l o que el problema es de minimización.

Como factores de estudio u optimización, se seleccionaron los porcentajes de los componentes de la formulación. En el Cuadro A1 se presentan los valores mínimos (-1) y máximos (+1) para cada factor. Obsérvese que en el cuadro se presenta la composición del principio activo, el cual no es un factor y siempre es constante.

COPIA NO CONTROLADA

Cuadro A.6.1: Fórmulas propuestas para el estudio de optimización de un preparado farmacéutico en suspensión.

Componente	Tipo variable	Composición
Principio activo	No variable	10,0%
Avicel (Veegum)	factor A	0,70% (0,70%)
Carboximetilcelulosa	factor B	0,1 – 0,5 %
Tween 80	factor C	0,1 – 0,5 %
Glicerina	factor D	0 – 5 %
Azúcar	factor E	0 – 20 %

En el caso del factor nominal A, o se utiliza Avicel, o se utiliza Veegum.

C) Matriz utilizada en la definición de los tratamientos o corridas experimentales:

La matriz estándar para un diseño factorial incompleto, con el que se pretende evaluar los efectos o influencias de los cinco factores, se establece en el siguiente Cuadro A2.

Cuadro A.6.2: Matriz del diseño experimental incompleto seleccionada

Tratamientos estándar	Factores				
	A	B	C	D	E
1	-1	1	1	1	1
2	1	-1	1	1	1
3	1	1	-1	1	1
4	1	1	1	-1	1
5	1	1	1	1	-1
6	-1	-1	-1	1	1
7	-1	-1	1	-1	1
8	-1	-1	1	1	-1
9	-1	1	-1	-1	1
10	-1	1	-1	1	-1
11	-1	1	1	-1	-1
12	1	-1	-1	-1	1
13	1	-1	-1	1	-1
14	1	-1	1	-1	-1
15	1	1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1
Contraste	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+

COPIA NO CONTROLADA

Este diseño matricial, es para dos niveles (n=2) y cinco factores (k=5). La última línea del cuadro anterior es adicional y representa la corrida experimental en las condiciones medias (-/+) del intervalo definido por cada mínimo y cada máximo. Así por ejemplo, la condición media para el factor nominal A es 0,35 % de Avicel y 0,35 % de Veegum, mientras que para el factor nominal B, la condición media es 0,3 % de carboximetilcelulosa. Esta corrida experimental adicional es necesaria para definir el contraste, el cual se utiliza para la valoración de la importancia estadística del efecto de cada factor.

El número de tratamientos necesarios sin replicados (N), depende de si se realiza un diseño completo o incompleto. El diseño factorial de este ejemplo es incompleto (en este caso con N = 16 = $2^4 = n^{k-1}$), pero si fuera completo, significaría la realización de 32 tratamientos (N = 32 = $2^5 = n^k$). Todo lo anterior, sin considerar las réplicas. Para diseños incompletos, no se puede evaluar las interacciones entre los factores. La información del tratamiento de interacciones solamente sirve como estimación de contraste alternativo, tal como se verá adelante.

En el diseño experimental, se decidió correr por duplicado (r = 2) cada tratamiento estándar y por quintuplicado (r = 5) la corrida o tratamiento correspondiente al contraste. El número de tratamientos considerando los replicados de los tratamientos es r*N (2*16 = 32), más las 5 réplicas del contraste.

D) Resultados obtenidos para las réplicas de los tratamientos y las réplicas del contraste:

Cuadro A.6.3: Resultados obtenidos en los tratamientos

Tratamientos	Respuesta (FR)
Contraste	14
1	17
1	19
2	20
2	22
3	4
3	5
4	6
4	7
Contraste	13
5	8
5	9
6	19
6	21
7	20
7	22
8	23
8	25
Contraste	15
9	14
9	16
10	15
10	17
11	16
11	18
12	6
12	7
Contraste	13
13	7
13	9
14	13
14	15
15	3
15	5
16	16
16	18
Contraste	14

COPIA NO CONTROLADA

En la realización de todo el experimento, los duplicados de cada tratamiento estándar se corrieron consecutivos y el quintuplicado del contraste se corrió cada 8 experimentos (cada cuatro tratamientos duplicados).

D) Tratamiento de los datos obtenidos para evaluar los efectos de los factores:

Se calculan los resultados medios (FR_{media}), su desviación estándar (s) y los grados de libertad (f) para cada tratamiento realizado, los resultados se presentan en el Cuadro A.6.4.

Cuadro A.6.4: Estimadores estadísticos de los resultados.

Corridas estándar	FR_{media}	s	f
1	18	1,41	1
2	21	1,41	1
3	4,5	0,71	1
4	6,5	0,71	1
5	8,5	0,71	1
6	20	1,41	1
7	21	1,41	1
8	24	1,41	1
9	15	1,41	1
10	16	1,41	1
11	17	1,41	1
12	6,5	0,71	1
13	8	1,41	1
14	14	1,41	1
15	4	1,41	1
16	17	1,41	1
Contraste	13,8	0,837	4

La Respuesta media (FR_{media} en la segunda columna del cuadro anterior), se multiplica por cada factor numérico (-1 o +1) de la matriz del Cuadro A2, sin considerar las filas del contraste.

CUADRO A.6.5: Matriz de análisis de efectos principales (orden cero)

Orden	A	B	C	D	E
1	-18	18	18	18	18
2	21	-21	21	21	21
3	4,5	4,5	-4,5	4,5	4,5
4	6,5	6,5	6,5	-6,5	6,5
5	8,5	8,5	8,5	8,5	-8,5
6	-20	-20	-20	20	20
7	-21	-21	21	-21	21
8	-24	-24	24	24	-24
9	-15	15	-15	-15	15
10	-16	16	-16	16	-16
11	-17	17	17	-17	-17
12	6,5	-6,5	-6,5	-6,5	6,5
13	8	-8	-8	8	-8
14	14	-14	14	-14	-14
15	4	4	-4	-4	-4
16	-17	-17	-17	-17	-17
SUMA	-75	-42	39	19	4
EFECTO	-9,375	-5,250	4,875	2,375	0,500

COPIA NO CONTROLADA

Obsérvese, que los valores numéricos absolutos de las cinco columnas son los mismos y que solamente tienen signos diferentes de acuerdo con el multiplicador de la matriz estándar. Esto para no dejarse impresionar por la gran cantidad de datos numéricos que se presentan.

Una vez realizada la multiplicación, se suman las columnas correspondientes para cada factor nominal (en la fila SUMA del Cuadro A5). Los valores numéricos de esta suma se dividen entre el factor N/2 (es decir la mitad de las corridas o tratamientos estándar sin replicado, en este caso 16/2 = 8), para obtener el valor numérico asignado a la influencia o efecto del correspondiente factor en cada columna.

Estos valores en la fila EFECTO, ya se pueden interpretar relativamente por su signo y por su magnitud, en función del problema de optimización planteado.

Por ejemplo de forma relativa, el factor A es el más importante en cuanto a su efecto (valor absoluto mayor de 9,375), mientras que el factor E es el de menor importancia (valor absoluto menor de 0,500). De acuerdo con la magnitud, la importancia relativa de los factores aumenta en el orden E, D, C, B y A.

Por otra parte, el signo negativo de los factores A y B, significa que para minimizar FR (Facilidad de Resuspensión), deben usarse los valores máximos de esos dos factores (porque FR disminuye cuando A y B aumentan). Por otra parte el signo positivo de los factores C, D y E, significan que para minimizar FR, deben usarse los valores mínimos de esos tres factores (porque FR disminuye cuando C, D y E disminuyen). Si el problema fuese de maximización las conclusiones serían las inversas.

E) Valoración de la importancia estadística de los efectos de los factores:

Para determinar la importancia estadística a un nivel de 95 %, se deben realizar pruebas de significancia. Para lo anterior, se puede utilizar el EFECTO para cada factor como un estimador de dispersión o varianza (s o s^2), o como un estimador de variable t de Student (t). Con estos estimadores se realizan pruebas contra parámetros tabulados de distribución F o distribución t de Student (o distribución normal estándar cuando los grados de libertad son 6 o más).

Existen una gran variedad de tratamientos para realizar las pruebas, debido a que se puede utilizar una gran variedad de enfoques dependiendo de la forma en que se calcula el contraste. Los diferentes enfoques tiene mayor o menor potencia estadística entre sí, principalmente debido a los grados de libertad o la forma de estimación del contraste. En este PON, solamente se presentará un ejemplo de todos los tratamientos que se pueden encontrar en la literatura especializada, en la cual incluyen hasta el análisis multivariante que escapa a los objetivos de este PON.

Como ejemplo de cálculo, se tomará solamente el factor A, tanto para el tratamiento F como para el tratamiento t de Student.

COPIA NO CONTROLADA

Prueba F:

Se toma el valor del EFECTO del Cuadro A5 y se eleva al cuadrado, considerándolo como un estimador de dispersión y calculando su correspondiente varianza (EFECTO = -9,375 y $EFECTO^2$ = 87,891; f = 7); además se toma el valor de la varianza del tratamiento de contraste del Cuadro A4 (s = 0,837 y s^2 = 0,700; f = 4). Con estos valores se realiza una prueba F, obteniendo el $F_{calculado}$ con el efecto cuadrático en el numerador y la dispersión del contraste en el denominador:

$$F_{calculado} = EFECTO^2 / s^2 \quad (7.14)$$

En el caso del factor A, el cálculo daría $F_{calculado}$ = 125,55. Se busca el correspondiente $F_{critico}$ para una cola al 95% de confianza en las tablas estadísticas ($F_{critico}(0,05; 7, 4) = 6,09$). Como el valor calculado es mayor que el valor crítico, el EFECTO del factor A es significativamente importante a un nivel del 5% de significancia (o equivalentemente a un coeficiente de confianza de 95%).

Prueba t de Student:

Se toma el valor del EFECTO del Cuadro A5 y se obtiene su valor absoluto, considerándolo como un estimador de sesgo ($|EFECTO|$ = 9,375) el cual se compara contra el valor de la media esperada para una distribución t de Student normalizada (es decir cero, 0). Se asumirá en este punto que la dispersión de ese valor está determinado por la dispersión del contraste del Cuadro A4 (s = 0,837, r = 5). Con estos valores se realiza una prueba t, obteniendo el $t_{calculado}$ con la siguiente ecuación:

$$t_{calculado} = |EFECTO| * \sqrt{r} / s$$

En el caso del factor A, el cálculo daría $t_{calculado}$ = 22,41. Se busca el correspondiente $t_{crítico}$ para dos colas al 95% de confianza en las tablas estadísticas ($t_{critico}(0,05; 4) = 2,78$). Como el valor calculado es mayor que el valor crítico, el EFECTO del factor A es significativamente importante a un nivel del 5% de significancia (o equivalentemente a un coeficiente de confianza de 95%).

En el Cuadro A6, se muestra los mismos análisis anteriores para todos los factores, incluyendo el factor A. De este cuadro obsérvese que solamente tienen importancia estadística al 95% de confianza los efectos o influencias de los factores A, B, C y D, mientras que el efecto de E se puede considerar meramente dispersión aleatoria y no significativo estadísticamente.

CUADRO A6.6: Resultados de las pruebas de significancia de los EFECTO

Prueba	A	B	C	D	E
$F_{calculado}$	125,55	39,37	33,95	8,05	0,35
$F_{crítico}$	6,09	6,09	6,09	6,09	6,09
Importancia F	99,9840	99,8427	99,7901	96,9139	11,1284
$t_{calculado}$	22,41	12,54	11,65	5,67	1,20
$t_{crítico}$	2,78	2,78	2,78	2,78	2,78
Importancia t	99,9977	99,9768	99,9690	99,5250	70,1985

COPIA NO CONTROLADA

En el cuadro anterior, además para ambas pruebas se presenta la valoración de la importancia estadística (como 1 menos el valor de significancia para la variable aleatoria calculada), la cuales se obtiene con las fórmulas de la hoja de cálculo de Excell, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Importancia estadística } F = [\ 1 - \text{Dist.F}(\ F_{calculado},\ 7,\ 4\ )] * 100 \quad (7.14)$$

$$\text{Importancia estadística } t = [\ 1 - \text{Dist.t}(\ t_{calculado},\ 4,\ 2\ )] * 100$$

En ambas ecuaciones, se presenta el formato de Excell para definir las distribuciones F y t de Student. En el segundo caso, el tercer argumento de la función (el número 2), indica que la prueba es a dos colas. Este análisis determina no solamente el orden de importancia de menor a mayor de los factores que ya se había establecido (E, D, C, B, A), sino que además indica que las consideraciones con el factor E son irrelevantes estadísticamente.

F) Tratamiento de los datos obtenidos para evaluar la interacción entre los factores:

Con la matriz del Cuadro A2, es posible obtener la matriz del Cuadro A7, con la cual se analizarían las interacciones de primer orden entre los factores. Obsérvese que cada columna se obtiene como producto de la multiplicación de cada fila de las correspondientes columnas de los factores, es decir la columna AB (o interacción AB), se obtiene de multiplicar el valor de la columna A por el valor de la columna B. Lo mismo se realiza para las otras interacciones de orden uno y para interacciones de órdenes superiores cuando interesan.

COPIA NO CONTROLADA

Cuadro A6.7: Matriz estándar de análisis de interacciones o influencias de orden uno entre los cinco factores de estudio.

Tratamientos Estándar	Combinación de Factores			
	AB	AC	AD	AE
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	1	1	1
3	1	-1	1	1
4	1	1	-1	1
5	1	1	1	-1
6	1	1	-1	-1
7	1	-1	1	-1
8	1	-1	-1	1
9	-1	1	1	-1
10	-1	1	-1	1
11	-1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	1
13	-1	-1	1	-1
14	-1	1	-1	-1
15	1	-1	-1	-1
16	1	1	1	1

Nuevamente se tiene que mencionar que en este caso por ser un diseño incompleto, el análisis que se indica no tiene ningún sentido, pues solamente tiene sentido evaluar las interacciones cuando el diseño es completo. Es por lo anterior que lo que se calcula a continuación solamente es con fines de ilustración de los cálculos que se deberían realizar en un diseño factorial completo utilizando todas los tratamientos correspondientes y las conclusiones que no tienen significado se detallan en letra itálica.

La Respuesta media (FR_{media} en la segunda columna del Cuadro A6.4), se multiplica por cada factor numérico (-1 o +1) de la matriz del Cuadro A6.7, sin considerar las filas del contraste. Esto permite obtener los valores del Cuadro A6.8.

COPIA NO CONTROLADA

Cuadro A6.8: Matriz de análisis de interacciones de orden uno

Orden	AB	AC	AD	AE
1	-18	-18	-18	-18
2	-21	21	21	21
4	6,5	6,5	-6,5	6,5
5	8,5	8,5	8,5	-8,5
6	20	20	-20	-20
7	21	-21	21	-21
8	24	-24	-24	24
9	-15	15	15	-15
10	-16	16	-16	16
11	-17	-17	17	17
12	-6,5	-6,5	-6,5	6,5
13	-8	-8	8	-8
14	-14	14	-14	-14
15	4	-4	-4	-4
16	17	17	17	17
SUMA	-10	15	3	4
INTERACCIÓN	-1,25	1,88	0,38	0,50

COPIA NO CONTROLADA

Nuevamente, obsérvese que los valores numéricos absolutos de las cinco columnas son los mismos y que solamente tienen signos diferentes de acuerdo con el multiplicador de la matriz estándar de interacciones. Esto para no dejarse impresionar por la gran cantidad de datos numéricos que se presentan.

Una vez realizada la multiplicación, se suman las columnas correspondientes para cada factor nominal (en la fila SUMA del Cuadro A8). Los valores numéricos de esta suma se dividen entre el factor N/2 (es decir la mitad de las corridas o tratamientos estándar sin replicado, en este caso 16/2 = 8), para obtener el valor numérico asignado a la influencia o interacción de los correspondientes factores en cada columna.

Estos valores en la fila INTERACCIÓN, ya se podrían interpretar relativamente por su magnitud. Por ejemplo de forma relativa, la interacción entre los factores AC sería la más importante (valor absoluto mayor de 1,88), mientras que la interacción entre los factores AD es la de menor importancia (valor absoluto menor de 0,38). De acuerdo con las magnitudes, la importancia relativa de las interacciones de los factores aumenta en el orden AD, AE, AB, AC.

G) Valoración de la importancia estadística de la interacción entre los factores:

Desde un punto de vista formal, el análisis estadístico de las interacciones es similar al presentado como para los efectos, solamente es necesario contrastar los valores de INTERACCIÓN en lugar de los valores de EFECTO.

Anexo 07

Tabla de contingencia y el contraste estadístico Chi-cuadrado

Cuando un grupo de analistas (*x*) participan en un número de pruebas de competencia (interlaboratorial o intralaboratorial), los resultados (*y*) se pueden clasificar, de manera dicotómica, en positivos (aceptables) y negativos (no aceptables). Las clases de *x* se escriben como $c_1,\ldots, c_r$, que en el caso particular expuesto sería la identificación de cada analista; mientras que las clases de *y* se describen como $d_1,\ldots, d_s$, es decir, resultados positivos y negativos para la situación desarrollada. En el cuadro A.7.1, se establece la distribución genérica de una tabla de contingencia, mientras que en el cuadro A.7.1 se observa un ejemplo de aplicación de este concepto.

Cuadro A.7.1 Definición de una tabla de contingencia.

	y			
x	d_1	d_k	d_s	**Total**
c_1	n_{11}	n_{1k}	n_{1s}	n_{1*}
c_h	n_{h1}	n_{hk}	n_{hs}	n_{h*}
c_r	n_{r1}	n_{rk}	n_{rs}	n_{r*}
Total	n_{*1}	n_{*k}	n_{*k}	n

COPIA NO CONTROLADA

A partir de esta tabla se define lo siguiente:

La distribución observada (f_{hk}) es igual al número de individuos para los cuales *x* toma el valor c_h e *y* el valor d_k, es decir:

$$f_{hk} = n_{hk}$$

Para determinar el total por fila (n_{h*}), se utiliza la siguiente ecuación:

$$n_{h*} = \sum_{k=1}^{s} n_{hk}$$

El total por columna (n_{*k}) se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$n_{*k} = \sum_{h=1}^{r} n_{hk}$$

La distribución esperada ($f_{h*}f_{*k}$) de las características descritas en *y*, se determinan a partir de la siguiente ecuación:

$$f_{h*}f_{*k} = \frac{n_{h*}n_{*k}}{n}$$

Para contrastar si la distribución observada no presenta diferencia estadísticamente significativa de la distribución esperada (hipótesis nula), se determina el chi-cuadrado (X^2) como sigue:

$$X^2 = \sum_{h=1}^{r}\sum_{k=1}^{s}\frac{(f_{hk} - f_{h*}f_{*k})^2}{f_{h*}f_{*k}}$$

El valor crítico del estadístico se selecciona del cuadro A.7.1, con $(r-1)(s-1)$ grados de libertad y un 95% de confianza. Si el valor de X^2 es menor al valor crítico, entonces se acepta la hipótesis nula.

Cuadro A.7.2. Valores críticos de X^2.

Números de grados de libertad	**Valor crítico p = 0,05**
1	3,841
2	5,991
3	7,815
4	9,488
5	11,070
6	12,592
7	14,067
8	15,507
9	16,919
10	18,307
11	19,675
12	21,026
13	22,362
14	23,685
15	24,996
16	26,296
17	27,587
18	28,869
19	30,144
20	31,410
21	32,671
22	33,924
23	35,172
24	36,415
25	37,652

Fuente: Sheskin, D. *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures*. 3th edition, New York: CRC Press Company, 2004, p. 1137.

COPIA NO CONTROLADA

Ejemplo para la evaluación de los parámetros de validación en métodos de análisis cualitativos

En el cuadro A.7.3, se observa el histórico de participación de un grupo de analistas en pruebas de competencias interlaboratoriales, en este cuadro se documenta el total de análisis realizados, el número de resultados positivos (aceptables) y el número de resultados negativos (no aceptables).

Para este ejemplo, se desea evaluar el grado de certeza de cada analista y el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por todos los analistas, la primera sería una forma de expresar la veracidad y la segunda una manera de reportar la precisión intermedia para metodologías cualitativas. El porcentaje de acierto (grado de certeza) se obtiene al aplicar la siguiente fórmula:

$$\%\ \text{acierto} = \frac{\text{Nº de resultados aceptables}}{\text{Total de análisis}} \times 100\%$$

$$\%\ \text{acierto (Pedro)} = \frac{7}{8} \times 100\% = 88\%$$

Este valor se evalúa mediante los criterios de aceptación establecidos para cada área pericial específica.

Los resultados esperados (positivos y negativos) y los residuales (positivos y negativos) se obtienen al aplicar el desarrollo estadístico descrito en este anexo por el uso del parámetro estadístico tabulado en el cuadro A.7.2. Al utilizar dichas formulas y los resultados positivos del analista Pedro, se obtienen los siguientes valores:

$$n_{h*} = \sum_{k=1}^{s} n_{hk} = 7 + 1 = 8$$

$$n_{*k} = \sum_{h=1}^{r} n_{hk} = 3 + 7 + 9 + \cdots + 3 = 88$$

$$f_{h*}f_{*k} = \frac{n_{h*}n_{*k}}{n} = \frac{8 \times 88}{97} = 7{,}26$$

Se sigue el mismo procedimiento para los resultados negativos y para los demás analistas. A partir de estos datos y según la fórmula descrita en este anexo, se determina el chi-cuadrado como sigue:

$$X^2 = \sum_{h=1}^{r}\sum_{k=1}^{s} \frac{(f_{hk} - f_{h*}f_{*k})^2}{f_{h*}f_{*k}} = \frac{(3-2{,}72)^2}{2{,}72} + \frac{(7-7{,}26)^2}{7{,}26} + \cdots + \frac{(0-0{,}28)^2}{0{,}28} = 7{,}834$$

COPIA NO CONTROLADA

El valor crítico para X^2 se obtiene del cuadro A.7.2, para 14 grados de libertad [$Gl = (15 - 1)(2 - 1) = 14$] y un 95% de confianza el valor reportado es 23,685. Al evaluar estos datos se obtiene que $X^2 < X^2_{crítico}$, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativa entre los resultados esperados y los resultados reportados por todos los analistas, por lo que se concluye que bajo las condiciones de trabajo utilizadas, los analistas presentan concordancia en los resultados reportados.

COPIA NO CONTROLADA

Cuadro A.7.3: ejemplo para la evaluación de los parámetros de validación en métodos de análisis cualitativos.

	Tabla de datos originales			**Tabla de contingencia**					
Perito	**Resultados positivos observados**	**Resultados negativos observados**	**Total de análisis**	**Resultados positivos esperados**	**Resultados negativos esperados**	**Total de análisis**	**Residuales positivos**	**Residuales negativos**	**Porcentaje de acierto**
Ana	3	0	3	2,72	0,28	3	0,02847	0,2784	100
Pedro	7	1	8	7,26	0,74	8	0,00915	0,0895	88
Juan	9	1	10	9,07	0,93	10	0,00057	0,0056	90
María	4	0	4	3,63	0,37	4	0,03796	0,3711	100
José	6	0	6	5,44	0,56	6	0,05694	0,5567	100
Carlos	7	0	7	6,35	0,65	7	0,06642	0,6495	100
Carmen	5	0	5	4,54	0,46	5	0,04745	0,4639	100
Francisco	4	1	5	4,54	0,46	5	0,06336	0,6195	80
Andrés	9	0	9	8,16	0,84	9	0,08540	0,8351	100
Lilliana	3	1	4	3,63	0,37	4	0,10898	1,0656	75
Karol	7	1	8	7,26	0,74	8	0,00915	0,0895	88
Ignacio	7	1	8	7,26	0,74	8	0,00915	0,0895	88
Sergio	7	1	8	7,26	0,74	8	0,00915	0,0895	88
Diego	7	2	9	8,16	0,84	9	0,16621	1,6252	78
Diana	3	0	3	2,72	0,28	3	0,02847	0,2784	100
Totales	88	9	97	88	9	97	0,72683	7,1068	91

COPIA NO CONTROLADA

X^2	**7,834**		**91**
Grados de libertad	**14**		
X^2 crítico	**23,685**		

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 08

Ejemplo para la obtención de parámetros para la valoración del grado de certeza en las pruebas interpretativas

Cuadro A8.1: ejemplo para la obtención de parámetros para la valoración del grado de certeza en las pruebas interpretativas.

Perito	N° de análisis realizados	N° de análisis acertados	Frecuencia de acierto observada (O_i)	E_i	E	X_1^2	X_2^2
Ana	3	3	1	0,915	0,909	0,008	0,009
Pedro	8	7	0,875	0,915	0,918	0,002	0,002
Juan	10	9	0,9	0,915	0,916	0,000	0,000
María	4	4	1	0,915	0,909	0,008	0,009
José	6	6	1	0,915	0,909	0,008	0,009
Carlos	7	7	1	0,915	0,909	0,008	0,009
Carmen	5	5	1	0,915	0,909	0,008	0,009
Francisco	5	4	0,8	0,915	0,923	0,014	0,016
Andrés	9	9	1	0,915	0,909	0,008	0,009
Lilliana	4	3	0,75	0,915	0,927	0,03	0,034
Karol	8	7	0,875	0,915	0,918	0,002	0,002
Ignacio	8	7	0,875	0,915	0,918	0,002	0,002
Sergio	8	7	0,875	0,915	0,918	0,002	0,002
Diego	9	7	0,778	0,915	0,925	0,021	0,023
Diana	3	3	1	0,915	0,909	0,008	0,009
Σ						0,127	0,146
Grados de libertad						14	13
$t_{crítico}$						6,57	5,89

COPIA NO CONTROLADA

E_i : *Frecuencia esperada del conjunto de analistas*

$$E_i = \frac{\sum_i^n O_i}{n} \text{ donde } n = 15 \text{ para este caso}$$

E : *Frecuencia esperada para los demás analistas, exceptuando al analista evaluado*

$$E = \frac{((\Sigma Oi) - Oi)}{n-1} \text{ donde } n = 15 \text{ para este caso}$$

X^2 : *Contraste de chi – cuadrado*

$$X_1^2 = \sum_i (O_i - E_i)^2 / E_i$$

$$X_2^2 = \sum_i (O_i - E)^2 / E$$

- Como $\sum X_2 < t_{crítico}$ entonces se rechaza la hipótesis nula H_o (H_o : Existe diferencia significativa entre la habilidad de los analistas)
- El intervalo de la frecuencia de acierto, comprendida entre la menor y mayor E, corresponde a: {90.9 % - 92.7 %}
- El promedio de la frecuencia de acierto ($\acute{E}$) corresponde a 91.5 %

$$\acute{E} = \frac{\sum_{i}^{n} E}{n} \; donde\, n = 15\, en\, este\, caso$$

- El coeficiente de variación de la frecuencia de acierto ($Cv_{\acute{E}}$)x100 corresponde a 0,71 %.

$Cv_{\acute{E}} = \acute{E} / S_{\acute{E}}$; donde $S_{\acute{E}}$ corresponde a la desviación estándar de la frecuencia de acierto ($\acute{E}$)

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 9
Estadístico para evaluar resultados de las pruebas interlaboratoriales

z-score:

La evaluación del desempeño de cada Laboratorio se efectúa utilizando el parámetro z-score definido como:

$$z_i = \frac{\overline{x_i} - x_{asign}}{\sigma_p}$$

donde zi es el valor del parámetro para el i-ésimo Laboratorio, xi es el promedio obtenido por el Laboratorio para el valor en particular, xasign es el mejor estimado del valor asignado al mensurando hecho por los organizadores (el valor real o consensuado de la concentración del analito en el material de prueba) y σp es la desviación estándar para la evaluación del desempeño ajustada al objetivo del análisis, dada por el proveedor de la prueba interlaboratorial.

Interpretación de los valores de z-score.

Una puntuación de cero implica un resultado perfecto. Esto ocurrirá muy raramente aún en los laboratorios más competentes.

Aproximadamente 95% de las puntuaciones "z" caerán entre "-2" y "+2" – El signo (i.e., - o +) corresponde a error negativo o positivo respectivamente. Puntuaciones en este rango se designan como "aceptables" o "satisfactorias".

Puntuaciones en los rangos "-2" a "-3" y "+2" a "+3" se esperan una vez en 20, así que un evento de esta clase se clasifica como "cuestionable".

Una puntuación fuera del rango de "-3" a "+3" sería muy inusual y debe tomarse como indicativa de que la causa del evento debe investigarse y remediarse. Calificaciones en este rango se clasifican como "acción requerida".

COPIA NO CONTROLADA

Estadísticos de consistencia dados por ASTM:

"h", para consistencia entre Laboratorios, dado por:

$$h_i = \frac{(\overline{X}_i - \overline{\overline{X}})}{s_{\overline{X}}}$$

Donde:

$\bar{X}_i$: es el promedio de las n réplicas reportadas por el i-ésimo laboratorio en un análisis específico.

$\bar{\bar{X}}$: es el promedio de los promedios reportados por los diferentes laborarorios.

$s_{\bar{x}}$: es la desviación estándar de los promedios de los laboratorios.

Para el contraste se utiliza el valor crítico de h, que se calcula como sigue:

$$h_{crit} = \frac{(p-1)t}{\sqrt{p(t^2+p-2)}}$$

Donde:

h_{crit} : es el valor crítico de la consistencia entre laboratorios, el cual se determina a partir de del valor de la t de Student a un nivel de significancia de 0,5% (dos colas) y p-2 grados de libertad.

p: es el número de laboratorios involucrados en la prueba.

Interpretación:

h es un estadístico de consistencia entre-laboratorios. Compara el promedio de las réplicas con el valor asignado (promedio global). A mayor valor absoluto de h, menor consistencia entre los resultados de un laboratorio particular respecto al resto de los laboratorios.

Cuando el valor de consistencia h para los laboratorios no supera el valor crítico calculado con un 95% de confianza, entonces no se observa ningún valor inconsistente entre los laboratorios, como para ponerlo en observación. Si ocurriera lo contrario, el laboratorio debe determinar la causa del comportamiento discrepante.

"k", para consistencia dentro de los laboratorios, dado por:

$$k_i = \frac{s_i}{s_r}$$

donde si es la desviación entre las n réplicas en un análisis específico y sr es la desviación estándar de la repetibilidad.

COPIA NO CONTROLADA

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{1}^{p} s^2}{p}}$$

donde:

s: es la desviación estándar obtenida por cada laboratorio.

p: es el número de laboratorios involucrados en la prueba.

Para el contraste se utiliza el valor crítico de k, que se calcula como sigue:

$$k_{crit} = \sqrt{\frac{p}{1 + \frac{(p-1)}{F}}}$$

Donde:

Kcrit: es el valor crítico de la consistencia entre laboratorios, el cual se determina a partir de del valor de una prueba F a un nivel de significancia de 0,5%. Los grados de libertad v1 son n-1, con n: número de réplicas, y v2 igual a (p-1)(n-1)

p: es el número de laboratorios involucrados en la prueba.

Interpretación:

k estadístico de consistencia intralaboratorio. Compara la desviación típica de las réplicas con la desviación típica combinada o de repetibilidad. Si k =1, la variabilidad de ese laboratorio es igual a la del resto. Si k >1 su variabilidad es mayor y si k <1 su variabilidad es menor. Valores altos de k representan variabilidad intralaboratorio, valores muy pequeños de k pueden indicar escasa sensibilidad en las escalas de medición u otros problemas asociados a las mediciones.

Cuando el valor de consistencia k dentro del laboratorio no supera el valor crítico calculado con un 95% de confianza especial; no se observa inconsistencia con respecto a la variabilidad dentro de los demás laboratorios, como para requerir alguna acción especial.

Si los resultados obtenidos en las pruebas presentan desvíos inaceptables con respecto al valor verdadero y con respecto a los demás laboratorios, según la interpretación de z-score, h y k, y los criterios de aceptación y rechazo establecidos para la veracidad y precisión del método en cuestión, identifique las causas de las discrepancias. Compruebe equipos, reactivos, aspectos operativos, interferencias, contaminaciones, estabilidad, a fin de minimizar el sesgo y demostrar la competencia.

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 10

Razones cualitativas

En la mayoría de los métodos analíticos no cuantitativos la respuesta analítica es dicotómica y como respuesta analítica se tiene:

Resultado positivo: Ocurre cuando se considera que está presente en la matriz de estudio una cantidad mínima detectable del analito de interés (o superior a ella) y por ello ha ocurrido una respuesta analítica.

Resultado Negativo: Ocurre cuando se considera que no está presente en la matriz de estudio el analito de interés, o se encuentra en una cantidad inferior a la mínima detectable, y por ello no ha ocurrido una respuesta analítica.

Procedimiento para determinar la selectividad de un método analítico tabular los datos de la siguiente manera:

A) Número de ensayos positivos con muestras positivas verdaderas
B) Número de ensayos positivos con muestras negativas verdaderas
C) Número de ensayos negativos con muestras positivas verdaderas
D) Número de ensayos negativos con muestras negativas verdaderas
E) Número de ensayos realizados con muestras positivas verdaderas
F) Número de ensayos realizados con muestras negativas verdaderas
G) Número de ensayos positivos
H) Número de ensayos negativos
I) Total de ensayos

COPIA NO CONTROLADA

Con los datos anteriores construir el Cuadro A.10.1

Cuadro A.10.1. Conjunto de datos para el cálculo de la selectividad, sensibilidad y especificidad en metodologías cualitativas.

	Valor de la característica		
Resultado de la prueba	Presente	Ausente	
Positivo	A	B	G=A+B
Negativo	C	D	H=C+D
	E=A+C	F=B+D	I=A+B+C+D

Se calculan los siguientes valores:

$$A_{esperado} = \frac{E * G}{I} \qquad B_{esperado} = \frac{F * G}{I}$$

$$C_{esperado} = \frac{E * H}{I} \qquad D_{esperado} = \frac{F * H}{I}$$

Con los parámetros calculados anteriormente realice las siguientes operaciones:

$$A - A_{esperado} = A^{\square}$$

$$B - B_{esperado} = B^{\square}$$

$$C - C_{esperado} = C^{\square}$$

$$D - D_{esperado} = D^{\square}$$

Obtenga los siguientes índices:

$$\alpha = \frac{(A^{\square})^2}{A_{esperado}} \qquad \beta = \frac{(B^{\square})^2}{B_{esperado}}$$

$$\frac{(C^{\square})^2}{C_{esperado}} \qquad \delta = \frac{(D^{\square})^2}{D_{esperado}}$$

Determinar la χ^2 calculada como sigue:

$$\chi^2 = \chi + \alpha + \beta + \kappa$$

La δ^2 calculada se compara con la χ^2 de las Tablas al 95% para "r" resultados y "c" características, con (r-1)(c-1) grados de libertad. Si la chi cuadrado calculada es mayor que el respectivo valor crítico, se concluye que bajo las condiciones de trabajo realizadas, el método analítico tiene una selectividad tal que su respuesta analítica permite diferenciar de manera estadísticamente significativa las muestras positivas verdaderas de las muestras negativas verdaderas.

Con la información del cuadro A.10.1, calcule los siguientes parámetros:

COPIA NO CONTROLADA

$$Sensibilidad = \frac{A}{A+C}$$

$$Especificidad = \frac{D}{D+B}$$

$$RazóndeFalsospositivos = RFP = \frac{B}{B+D}$$

$$RazóndeFalsosnegativos = RFN = \frac{C}{A+C}$$

$$Confiabilidad = (1 - RFP - RFN) * 100$$

$$Eficiencia = \frac{A+D}{A+B+C+D}$$

Ejemplo de aplicación:

Se realiza la evaluación de un método de análisis cualitativo colorimétrico de observación visual, para lo cual se efectúan los análisis a una concentración cercana al límite de detección y a un nivel de concentración superior. Los análisis fueron realizados por tres analistas, cada uno de los cuales analizó diez muestras positivas verdaderas y diez muestras negativas verdaderas en condiciones de ensayos ciegos. Para efectos ilustrativos los cálculos se harán solo para los datos obtenidos cerca del límite de detección:

Cuadro A.10.2 Datos experimentales para el cálculo de la selectividad, sensibilidad y especificidad de una prueba colorimétrica.

Muestra	ESPERADO*	Analista 1	Analista 2
M1	0	0	0
M2	0	0	0
M3	1	1	0
M4	0	0	0
M5	0	0	0
M6	0	0	0
M7	0	0	0
M8	0	0	1
M9	0	0	1
M10	0	0	0
M11	1	1	1
M12	0	0	0
M13	1	0	1
M14	1	1	1
M15	1	0	1
M16	1	1	1

COPIA NO CONTROLADA

M17	1	1	0
M18	1	1	1
M19	1	0	0
M20	1	1	1

*0: negativo, 1: Positivo

Para el conjunto de datos del cuadro A.10.2, siguiendo el esquema del cuadro A.10.1, se tiene:

Cuadro A.10.3. Conjunto de datos para el cálculo de la selectividad, sensibilidad y especificidad de una prueba colorimétrica.

	Valor de la característica		
Resultado de la prueba	Presente	Ausente	
Positivo	23	2	25
Negativo	7	28	35
	30	30	60

COPIA NO CONTROLADA

De ahí se calculan los parámetros para la prueba de chi cuadrado, como sigue:

$$A_{esperado} = \frac{30 * 25}{60} = 12{,}5 \qquad B_{esperado} = \frac{30 * 25}{60} = 12{,}5$$

$$C_{esperado} = \frac{30 * 35}{60} = 17{,}5 \qquad D_{esperado} = \frac{30 * 35}{60} = 17{,}5$$

$$A - A_{esperado} = 23 - 12{,}5 = 10{,}5$$

$$B - B_{esperado} = 2 - 12{,}5 = -10{,}5$$

$$C - C_{esperado} = 7 - 17{,}5 = -10{,}5$$

$$D - D_{esperado} = 28 - 17{,}5 = 10{,}5$$

$$= \chi + \alpha + \beta + \kappa$$

$$2 = \frac{(10{,}5)^2}{12{,}5} + \frac{(-10{,}5)^2}{12{,}5} + \frac{(-10{,}5)^2}{17{,}5} + \frac{(10{,}5)^2}{17{,}5} = 30{,}2$$

$$Sensibilidad = \frac{23}{30} = 0{,}77$$

$$Especificidad = \frac{28}{30} = 0{,}93$$

$$RazóndeFalsospositivos = RFP = \frac{2}{30} = 0{,}067$$

$$RazóndeFalsosnegativos = RFN = \frac{7}{30} = 0{,}23$$

$$Confiabilidad = (1 - RFP - RFN) * 100 = 70{,}3\%$$

$$Eficiencia = \frac{23 + 28}{60} = 0{,}85$$

Los criterios de aceptación y rechazo deberán ser establecidos en el plan de validación de acuerdo con lo que se suela aceptar para cada tipo de prueba y tomando en cuenta lo definido como límite de detección si la evaluación se hace a ese nivel (e.g. concentración en la que se puede obtener hasta un 20% de falsos negativos). Es muy común encontrar que el criterio para la aceptación de estos parámetros sea de un 5% en el caso de los falsos positivos y negativos, mientras que la sensibilidad, especificidad y eficiencia son aceptables cuando son iguales o superiores al 95%.

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 11

Ejemplo de la evaluación de la reproducibilidad utilizando el contraste de rangos y signos Wilcoxon.

El siguiente cuadro proporciona el porcentaje de acierto en la Sección para cada prueba interlaboratorial en la que se ha participado, así como el porcentaje de acierto de los demás laboratorios participantes en cada una de estas pruebas.

Cuadro A.12.1. Porcentajes de acierto, por prueba interlaboratorial, de la Sección y de los demás laboratorios participantes.

Prueba interlaboratorial	% acierto en la Sección	% acierto global (excluyendo a la Sección)
2007	100,0	98,7
2008	97,1	98,8
2009	83,3	92,5
2010	83,3	95,3
2011	92,9	98,8
2012	100,0	91,3
2013	100,0	98,2

COPIA NO CONTROLADA

Donde el porcentaje de acierto en la Sección se calcula tomando en cuenta los resultados de todos los analistas participantes de la siguiente manera:

% acierto en la Sección = $\frac{\textit{análisis acertados en la Sección}}{\textit{análisis realizados en la Sección}} \cdot 100$

El porcentaje de acierto global corresponde al porcentaje de resultados concordantes de los demás laboratorios con respecto al valor esperado.

% acierto global = $\frac{\textit{análisis acertados por los demás laboratorios}}{\textit{análisis realizados por los demás laboratorios}} \cdot 100$

La aprobación o rechazo de la hipótesis nula (Ho: No hay evidencia que existe diferencia en los resultados de la Sección con respecto a los demás laboratorios) se realiza con base en los cálculos que se observan en el siguiente cuadro.

Cuadro A.12.2. Desarrollo para el cálculo del estadístico de contraste en la prueba de Wilcoxon.

Prueba interlaboratorial	% acierto en la Sección	% acierto global (excluyendo a la Sección)	Diferencia	Diferencia ordenada	Rangos
2007	100,0	98,7	1,3	1,3	1
2008	97,1	98,8	-1,7	-1,7	-2
2009	83,3	92,5	-9,2	1,8	3
2010	83,3	95,3	-12	-5,9	-4
2011	92,9	98,8	-5,9	8,7	5
2012	100,0	91,3	8,7	-9,2	-6
2013	100,0	98,2	1,8	-12	-7

Con base en el cuadro anterior se calcula la suma de rangos positivos y la suma de rangos negativos (valor absoluto), el estadístico de contraste corresponderá a la suma de menor valor:
Suma de rangos positivos = 9
lSuma de rangos negativosl = 19

En este caso el estadístico de contraste es 9. Para n =7(ver cuadro A.12.3), el estadístico de contraste tiene que ser ≤2 para que se pueda rechazar la hipótesis nula a un nivel de significación P = 0.05.

En este caso tiene que aceptarse la hipótesis nula: No hay evidencia sobre la existencia de diferencia de la Sección con respecto a los demás laboratorios.

Cuadro A.12.3. Valores críticos para el estadístico del contraste P = 0.05.

n	Contraste de una cola	Contraste de dos colas
5	0	N/A
6	2	0
7	3	2
8	5	3
9	8	5
10	10	8
11	13	10
12	17	13
13	21	17
14	25	21
15	30	25

COPIA NO CONTROLADA

Anexo 12

Para la evaluación de la consistencia intralaboratorial, en el Netherlands Forensic Institute realizaron un estudio en el que compararon las conclusiones de los analistas balísticos (de comparación) cuando los examinadores se enfrentaban secuencialmente y de forma emparejada a la comparación de los mismos elementos balísticos en casos de rutina en un período entre 1997 y el 2006. La dinámica consistió en que el primer examinador analizaba los indicios de un caso real y luego los trasladaba a un segundo examinador, quien no tenía acceso a la solicitud de dictamen pericial (para evitar el sesgo de confirmación) y en condiciones en las que el segundo examinador no conocía el resultado del primero. Los resultados de este estudio para 153 casos emparejados se muestran a continuación.

Cuadro A.13.1 Concordancia entre el primer y el segundo examinador en la comparación balística en análisis secuenciales y emparejados.

		Examinador 2			
		Individualización	Exclusión	Inconcluyente	
Examinador 1	Individualización	85	0	8	93
	Exclusión	3	10	3	16
	Inconcluyente	8	3	33	44
		96	13	44	153

Origen: Kerstholt , J; Eikelboom, A.; Dijkman,T.; Stoel, R.;Hermsen, R.; van Leuven, B. Does suggestive information cause a confirmation bias in bullet comparisons? *Forensic Science International* 2010, *198*, 138–142

Los datos se pueden evaluar a través de la prueba de rangos y signos de Wilcoxon, a partir de todas las comparaciones que originaron el Cuadro A.13.1 para determinar si hay consistencia en los resultados de los peritos (individualizaciones, exclusiones o ambas), o si hay más tendencia a individualizar o excluir (menos casos inconcluyentes) dependiendo de la posición en la que se esté (examinador 1 versus examinador 2). Al implementar este tipo de ejercicio se debe involucrar a la mayor cantidad de personal pericial capacitado en el área para tener la el número más grande de combinaciones (parejas) y la mayor cantidad de comparaciones por pareja según el rol de examinador 1 o examinador 2.

Para ejemplificar la evaluación de la consistencia entre los peritos, tomemos al par perito A y perito B, donde el perito A es el examinador 1 y el perito B es el examinador 2. Ellos han trabajado en ese rol en 6 casos de comparación de balas y los resultados obtenidos se muestran en el A.13.2

Cuadro A.13.2 Comparación de los resultados emparejados en comparaciones balísticas secuenciales e independientes realizadas por dos peritos, según conclusión emitida

COPIA NO CONTROLADA

Pareja	Resultado Perito 1 (A)	Resultado Perito 2 (B)
A-B	1	NC
	NC	1
	1	1
	1	1
	0	0
	1	NC
Total individualizante	4	3
Total excluyente	1	1
Total inconcluyente	1	2

1: individualizante, 0: excluyente, NC: No concluyente o gris

Cuadro A.13.3 **Comparación de los resultados emparejados de individualización de dos peritos en comparaciones balísticas secuenciales e independientes (con 12 parejas en total), evaluando las diferencias a través de la Prueba de los rangos y los signos de Wilcoxon.**

Pareja	Cantidad individualizaciones Perito 1	Cantidad individualizaciones Perito 2	Diferencia	Rango
Pareja 1 (A-B)	4	3	1	4
Pareja 2	2	3	-1	-4
Pareja 3	3	2	1	4
Pareja 4	1	3	-2	-9
Pareja 5	2	3	-1	-4
Pareja 6	2	1	1	4
Pareja 7	3	4	-1	-4
Pareja 8	1	3	-2	-9
Pareja 9	0	1	-1	-4
Pareja 10	1	1	0	N/A
Pareja 11	0	2	-2	-9
Pareja 12	2	2	0	N/A
Suma de rangos positivos				12
Suma de rangos negativos				-43
Valor del estadístico W				12
Valor crítico de W para 2 colas, N=10 y				8

COPIA NO CONTROLADA

p=0,05

Conclusión: No hay diferencia significativa entre el grado de individualización del examinador 2 con respecto al examinador 1 con una $p \leq 0,05$

El ejemplo anterior puede extenderse a las exclusiones realizadas por el examinador 1 versus el examinador 2, o para determinar si el grado de conclusión (individualización o exclusión) de un examinador es mayor (o extremo) que el del otro, en cuyo caso la evaluación estadística se realiza a través de la prueba de Wilcoxon de una cola.

COPIA NO CONTROLADA