



PRESENTACION MEXICO CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Docente Universidad de El Salvador

Validación

Dr. ANTONIO VASQUEZ HIDALGO

doctorvasquez@yahoo.com

- **Validación:**

- “Es una confirmación mediante evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método según norma **ISO....**”.

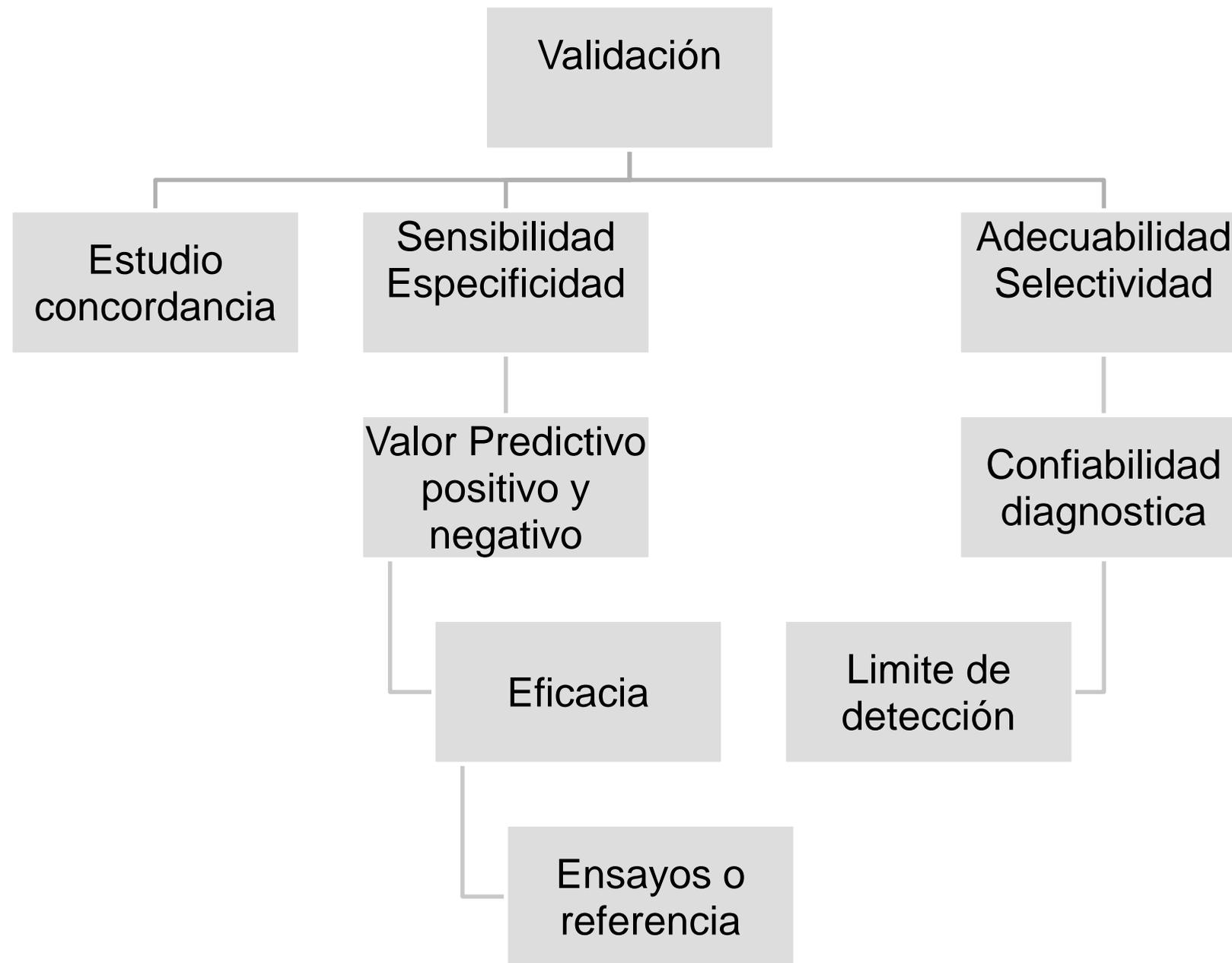


Objetivos

1. Analizar los fundamentos del método de validación cualitativo y cuantitativo según normas ISO
2. Recordar y analizar estadística descriptiva e inferencial.
3. Identificar algunos ejemplos del método de validación.



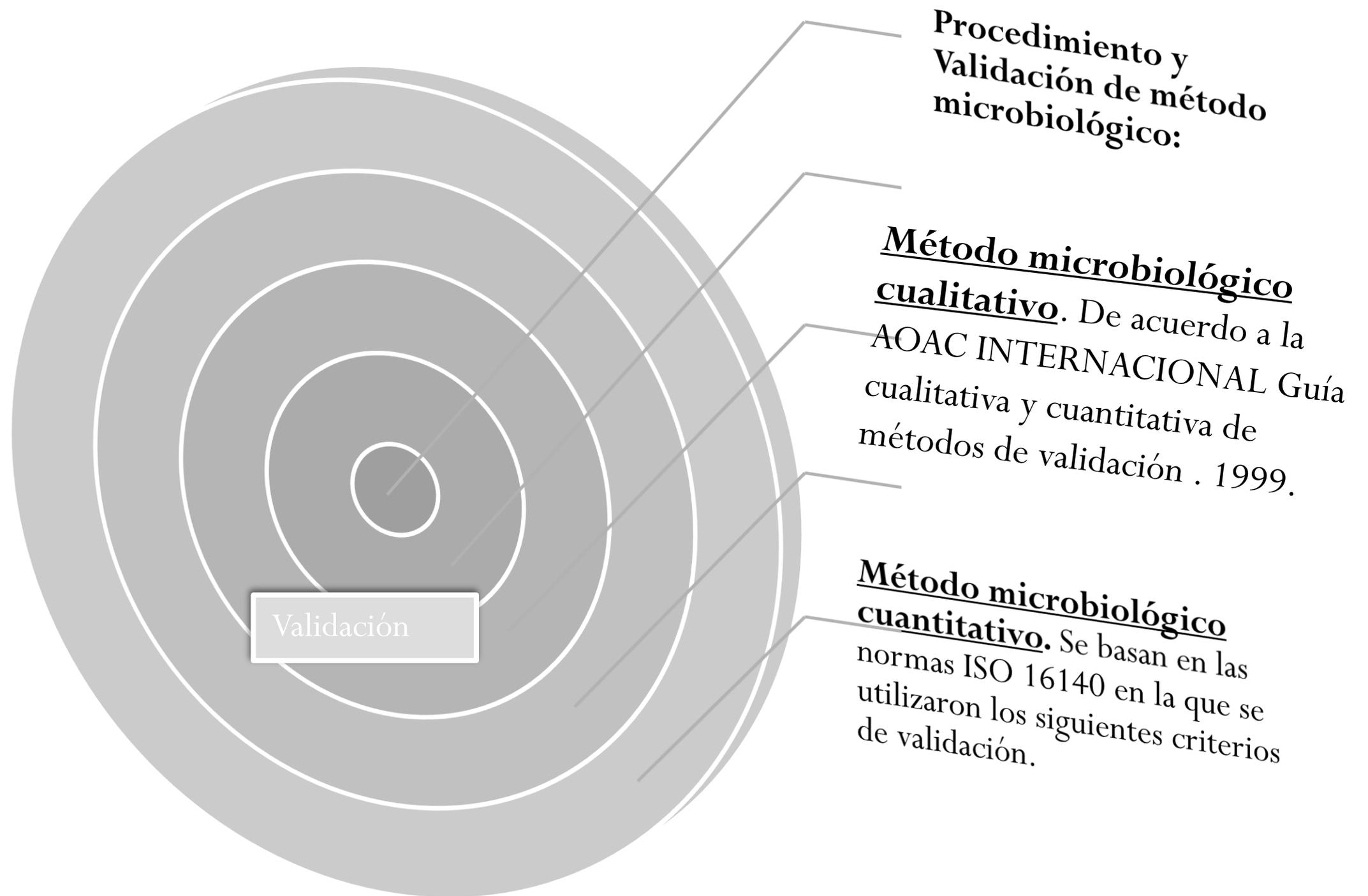
Marco Referencial. Norma ISO 16140:1999- Para análisis cualitativo.



Para el estudio análisis cualitativo mas que cuantitativo.



VALIDACION DEL METODO

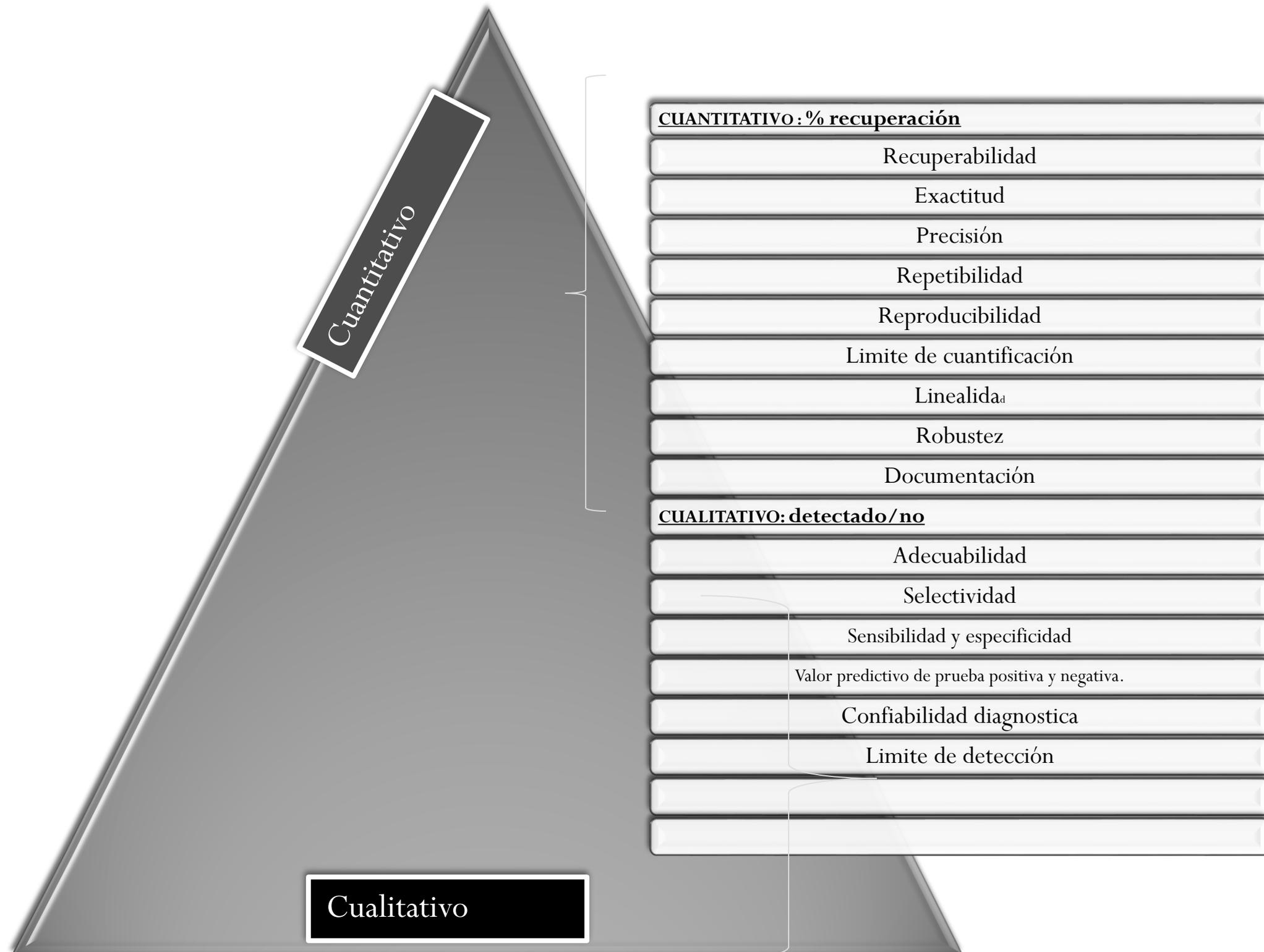


- **Procedimiento y Validación de método microbiológico**

- Método microbiológico **cuantitativo**. De acuerdo a la AOAC INTERNACIONAL Guía cualitativa y cuantitativa de métodos de validación . 1999. Estableciendo 1ª muestras natural contaminadas, 2ª contaminación artificial por mezcla, 3ª muestras inoculadas y 4ª materiales de referencia. Respuesta SI/NO
- Método microbiológico **cuantitativo**. Se basan en las normas ISO 16140 en la que se utilizaran los siguientes criterios de validación: Se estudia exactitud, falsos negativos y positivos, especificidad (limite de detección, linealidad), precisión (repetibilidad y reproducibilidad), incertidumbre. Respuesta % de recuperación.



Criterios de evaluación según guía de validación de métodos microbiológicos Internacionales AOAC(International Qualitative and Quantitative. Microbiology Guidelines form Methods Validation).1999 y Guía de métodos analíticos no cuantitativos y cuantitativos.



1. **Adecuabilidad.** Consiste en corroborar que los componentes y reactivos involucrados en la obtención de los datos funcionen adecuadamente. Verificar fecha caducidad, presencia o ausencia del analito. (Agua destilada y Lugol)

Interpretación será: existe adecuabilidad si la verificación de las características es adecuada para el método.



- **2.Selectividad.** se investigara si el resultado del método alternativo diferencia analito positivo de los negativos . En la que tienen comportamientos semejantes según características. Se utilizara procedimiento estadístico para determinar la selectividad del método alternativo por la siguiente formula:

c) Calcular los siguientes valores

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

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

d) Realizar las siguientes operaciones

$$\begin{aligned} A - A_{\text{esperado}} &= \text{-----} = A^* \\ B - B_{\text{esperado}} &= \text{-----} = B^* \\ C - C_{\text{esperado}} &= \text{-----} = C^* \\ D - D_{\text{esperado}} &= \text{-----} = D^* \end{aligned}$$

Su interpretación será: si X_i calculada es mayor que X_i tablas se concluye que el método analítico tiene selectividad con un nivel de confianza 95 %. Por el caso contrario si X_i calculada es menor que X_i tablas el método analítico carece de selectividad.



- **3. Sensibilidad y especificidad.** La sensibilidad es la probabilidad de que el analito este presente resulte positiva y la especificidad es la probabilidad de que el analito en la muestra estudiada no este el analito resulte negativa.

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

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

Su interpretación será: Si la sensibilidad es menor de 0.95 el método analítico no tiene sensibilidad, si la sensibilidad es **mayor o igual a 0.95** el método analítico tiene buena sensibilidad. Si la **especificidad** es menor de 0.95 el método analítico no tiene buena especificidad, si la **especificidad es mayor o igual de 0.95** el método analítico tiene buena especificidad



- **4. Valor predictivo positivo.** Probabilidad de que el analito este presente o en la cantidad mínima detectable cuando la prueba resulte positiva.

Su interpretación será: para que sea estadísticamente valido, se dice **si VPP es menor a 0.95** el método analítico no tiene buen valor predictivo positivo, **si VPP es mayor o igual a 0.95** el método analítico tiene buen valor predictivo positivo.

- **Valor predictivo negativo.** Probabilidad de que el analito de interés esta ausente o en cantidad inferior a la mínima detectable, cuando la prueba resulte negativa.

Su interpretación será: **si VPN es menor a 0.95** el método no tiene buen valor predictivo negativo, **si VPN es mayor o igual a 0.95** el método analítico tiene buen valor predictivo negativo.



- **5. Confiabilidad diagnóstica.** Probabilidad de detectar correctamente el analito de interés.

$$P(G^+|T^+) = \frac{\left(\frac{A}{A+C}\right) \left(\frac{A+C}{A+B+C+D}\right)}{\left(\frac{A}{A+C}\right) \left(\frac{A+C}{A+B+C+D}\right) + \left(\frac{B}{B+D}\right) \left(\frac{B+D}{A+B+C+D}\right)}$$

Interpretación estadística será: Si $P(G)T$ es menor a 0.95 el método analítico no tiene buena confiabilidad diagnóstica para detectar correctamente el sustrato de interés. Si $P(G)T$ es **mayor o igual a 0.95** el método analítico tiene buena confiabilidad diagnóstica para detectar correctamente el sustrato de interés

Ej si detecta el 95 % de las muestras el analito.



- **6.Limite de detección.** Es la mínima cantidad de analito detectado en una muestra, y no necesariamente cuantificar.

Interpretación estadística será : Si la respuesta analítica de al menos el 5% de la muestra sea negativa.



Criterios de evaluación según guía de validación de métodos microbiológicos por la AOAC. (ASOCIACION OFICIAL DE QUIMICOS ANALISTAS para métodos analíticos cuantitativos. Norma ISO 16140.



- **7. Exactitud.** Capacidad que tiene el método analítico para dar resultados lo más próximo posible al valor real .
- Su criterio de aceptación es la Prueba t de Student. y ANOVA.

VARIABLE	GL	SC	CM	FC	FT
METODO	2				
REPETICION	10				
ERROR	20				
TOTAL	32				

Interpretación estadística será: Si F_c calculado es mayor que F_t tablas, entonces se acepta la hipótesis de investigación y se rechaza la hipótesis nula por lo que existe diferencias estadísticamente significativas, por el contrario .Si F_c calculado es menor que F_t tablas entonces se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis de investigación



- **8. Precisión.** Capacidad que tiene el método para encontrar el analito de interés, cuando se aplica repetidamente en una muestra utilizando el método de referencia y el evaluado.
- Se utiliza estimando: análisis de varianza, desviación estándar o coeficiente de variación (CV) de la repetitibilidad del método, coeficiente de variación (Cv) de la reproductibilidad entre dos analistas. Así como tablas de contingencia para estimar nivel de significancia entre las muestras.

Su interpretación estadística será: t-student: Si T_c es mayor que T_t se acepta hipótesis a y se rechaza hipótesis nula, por lo tanto p es menor de 0.05. No debe exceder al 15% del CV.



- **9. Repetibilidad:** Si las repeticiones de una muestra se obtienen bajo las mismas condiciones de ensayo (mismo analista, mismo día, mismo equipo).
- Se usara la siguiente formula: **VARIANZA** (s^2): es el promedio del cuadrado de las distancias entre cada observación y la media aritmética del conjunto de observaciones.

Interpretación estadística será: mientras **mayor sea la dispersión de las observaciones** entre la observación uno y dos, entonces mayor es la desviación respecto a la media aritmética y por ende mas alto el valor numérico de la varianza. Cuanto mayor sea la varianza mayor dispersión existirá y por lo tanto menor representatividad tendrá la media aritmética



- **10. Reproducibilidad intralaboratorio:** Capacidad que tiene la técnica de ser reproducido. Se determina por la capacidad que tiene el método de ser reproducido para detectar el analito de interes por diferentes analistas. Dos analistas realizaran por duplicado muestra más control. Se utilizaran coeficiente de variación. Se usara Coeficiente de Variación.

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

Interpretación estadística será: si el calculo es mayor con respecto al otro, indica que presento una mayor dispersión con respecto al otro de la media, caso contrario si es menor el coeficiente de variación indica que presento una menor dispersión respecto a la media que el numero 1. Es decir el menor coheficiente de variación indica que presento menor dispersión con respecto a la media comparado con el otro.



- **11. Limite de cuantificación.** Es la cantidad mínima del analito que puede obtenerse, o es la capacidad que tiene el método de recuperar el analito.

$$\% \text{ recuperación} = \left[\frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor de referencia}} \right] \times 100$$

- Interpretación estadística por frecuencia será: cuanto se recupero y determinando **porcentaje de recuperación mayor o igual a 95 % recuperado.**



- **12. Linealidad.** Capacidad del método en que sus resultados son directamente proporcionales al analito.

$$x = \bar{x} + \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_y^2} (y - \bar{y}) \quad y = \bar{y} + \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x^2} (x - \bar{x})$$

Interpretación estadística será: Cuando al aumentar una variable crece también la otra, la correlación es directa.
Entonces si r se aproxima a $+1$ entonces es directa y si es -1 entonces es inversa la relación.



- **13. Robustez.** Consiste que a menores concentraciones de volumen, la prueba tiene la capacidad de identificar el analito por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y proporciona un índice de confiabilidad durante su uso.



- ... Gracias

