



República de Guatemala



VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS, FÍSICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

Licda. Lucrecia Arriola
Guatemala, 11 de septiembre de 2012

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

I. GENERALIDADES



OBJETIVOS DEL CURSO

- 1. Intentamos contestar las siguientes preguntas:
 - ¿Qué es validar?
 - ¿Por qué valido?
 - ¿Para qué valido?
 - ¿Cuándo valido?
 - ¿Cómo valido?
- 2. Conocer la diferencia entre Validación y Verificación
- 3. Conocer los requisitos de las normas internacionales sobre la validación de métodos

¿¿VALIDACIÓN??



LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS

¿Por qué es necesaria la validación analítica?



Generar confianza

¿Cuál es el propósito de la validación analítica?



**Métodos reproducibles,
y confiables**

¿Qué es validación de métodos analíticos?

- **Validación:** Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista.
- **Validación de un procedimiento analítico:** Procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

¿Qué es validación de métodos analíticos?

- Es realizar un conjunto de pruebas de manera de:
 - a) Comprobar varios aspectos del comportamiento del método.
 - b) Establecer que sirve para el fin previsto.
- La validación implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.

¿Qué es verificación de métodos?

- **Verificación:** Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados.
- Indicar el proceso que lleva a cabo el laboratorio con el fin de **demostrar su capacidad** para ejecutar correctamente un método normalizado cuando lo realiza exactamente como está descrito en la norma.

¿Para qué válido un método analítico?

Para cumplir con requisitos de las normas internacionales:

- a) BPM (Industria Farmacéutica)
- b) Norma ISO 17025 (Acreditación de Laboratorios de Ensayo y de Calibración)
- c) Norma ISO 15189 (Acreditación de Lab. Clínicos)
- d) Organismos Internacionales como FAO, USP y otras farmacopeas, OMS, ICH (Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización)



¿Para qué valido un método analítico?

Para emitir resultados exactos y precisos, que sean reproducibles para generar la confianza en nuestros clientes.

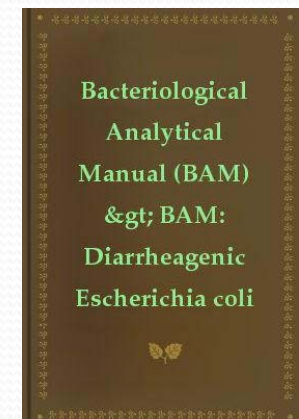
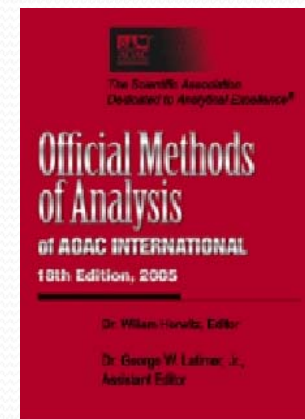
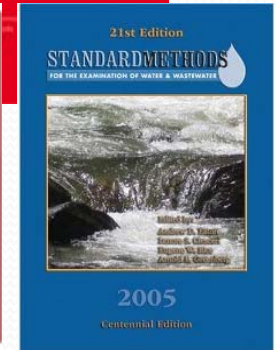


¿Cuáles son los tipos de métodos?

1. Métodos Normalizados:

Método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente. (Ref. ILAC-G18).

NOTA: El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.

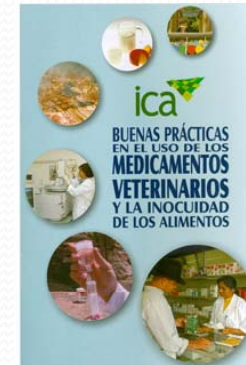


¿Cuáles son los tipos de métodos?

2. Métodos No Normalizados:

Método analítico desarrollado por un tercero o que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado. (Ref. ILAC-G18).

NOTA: El desarrollo del método, así como su adaptación, incluyen la etapa de su validación.



¿Cuáles son los tipos de métodos?

3. Métodos Desarrollados por el Laboratorio:

Método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollado por el propio laboratorio.

NOTA: El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.



¿Qué métodos se validan?

1. Los Métodos No Normalizados.
2. Los Métodos diseñados por el Laboratorio.
3. Los Métodos Normalizados que han sido modificados por el Laboratorio o utilizados fuera del alcance previsto.

¿Qué métodos se validan?

La validación de los métodos de ensayo debe:

- Reflejar las condiciones reales de ensayo.
- La extensión de la validación necesaria dependerá del método y su aplicación.
- La debe realizar personal calificado para esa actividad.
- En todos los casos un parámetro para la validación de ensayos es la descripción del método de ensayo.

¿Qué métodos se verifican?

1. Los Métodos Normalizados.
2. Los Métodos Oficiales.
3. Los Métodos de Org. Nacionales o Internacionales Reconocidos.

Es recomendable la utilización de métodos normalizados cuando éstos estén disponibles y sean apropiados.

"El laboratorio debe confirmar que puede aplicar correctamente los métodos normalizados antes de las pruebas o calibraciones. Si el método normalizado cambia, la confirmación se repetirá ". USP

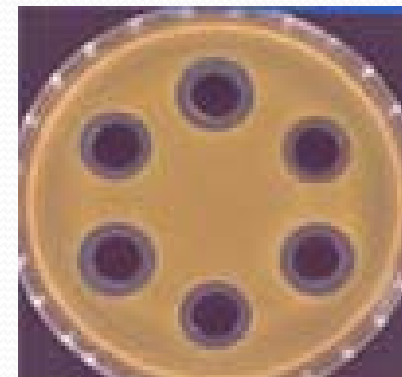
¿Cómo se dividen los métodos según el RTCA. 11.03.39: 06 ?

1. Categoría I
2. Categoría II
3. Categoría III
4. Categoría IV
5. Métodos Microbiológicos

¿Qué procedimientos analíticos se validan según el RTCA. 11.03.39: 06 ?

Se deben validar los siguientes procedimientos analíticos químicos, físicos y microbiológicos:

Categoría I: pruebas cuantitativas del contenido del principio activo, son procedimientos químicos o microbiológicos que miden el analito presente en una muestra determinada.



¿Qué procedimientos analíticos se validan según el RTCA. 11.03.39: 06 ?

Categoría II: pruebas para la determinación del contenido de impurezas o de valores límites para el control de impurezas. Pueden ser pruebas cuantitativas o una prueba cualitativa para determinar si la impureza está presente en la muestra por encima o por debajo de un valor límite especificado.



¿Qué procedimientos analíticos se validan según el RTCA. 11.03.39: 06 ?

Las categorías I y II miden con exactitud las características de pureza de la muestra. Los parámetros de validación requeridos por una prueba cuantitativa son diferentes a los de una prueba cualitativa de cumplimiento de límite.



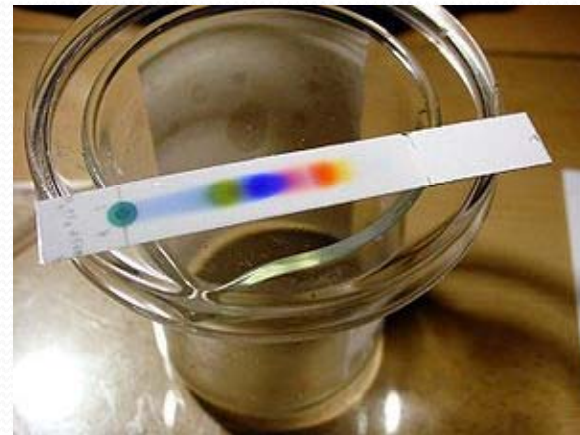
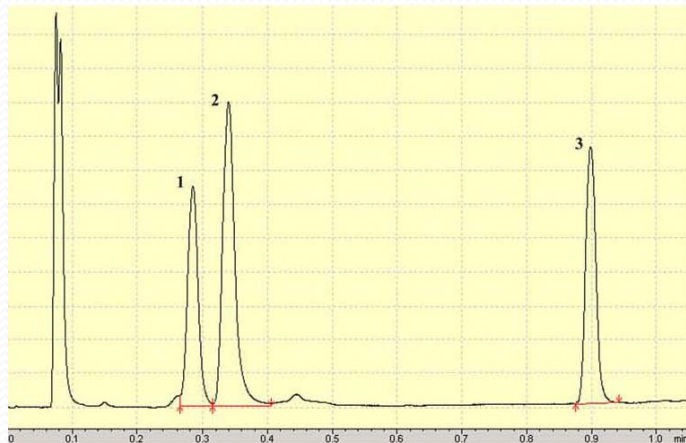
¿Qué procedimientos analíticos se validan según el RTCA. 11.03.39: 06 ?

Categoría III: son pruebas fisicoquímicas que miden características propias del desempeño del medicamento, por ejemplo la prueba de disolución. Las características de la validación son diferentes a las de las otras pruebas, aunque las pueden incluir.



¿Qué procedimientos analíticos se validan según el RTCA. 11.03.39: 06 ?

Categoría IV: pruebas de identificación. Aquellas que se realizan para asegurar la identidad de un analito en una muestra. Esto normalmente se realiza por comparación de una propiedad de la muestra, contra la de un estándar de referencia, por ejemplo espectros, comportamiento cromatográfico, reactividad química y pruebas microcristalinas.



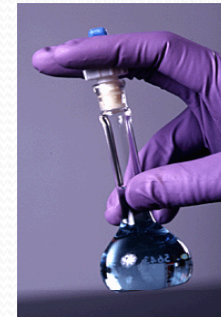
¿Qué procedimientos analíticos se validan según el RTCA. 11.03.39: 06 ?

Pruebas microbiológicas: aquellas que se realizan para asegurar la calidad microbiana del medicamento.



¿Cómo seleccionar e implementar un método analítico nuevo?

1. De preferencia, que sea un método normalizado de versión reciente.
2. Que el método sea apropiado para el tipo de muestra a analizar.
3. Determinar si el Laboratorio cuenta con personal capacitado para el análisis a realizar.
4. Determinar si el Laboratorio cuenta con las instalaciones y condiciones ambientales requeridas para el análisis.



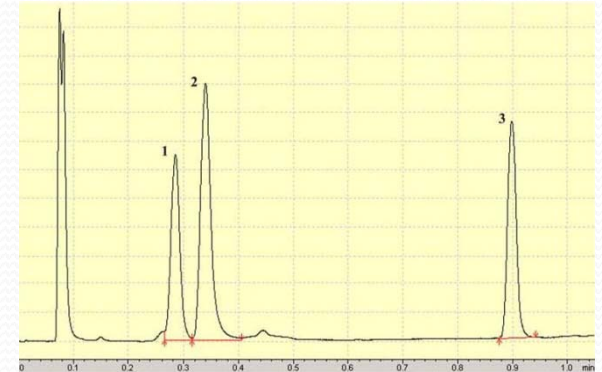
¿Cómo seleccionar e implementar un método analítico nuevo?

5. Descripción del procedimiento incluyendo el alcance del método (aplicabilidad, tipo), tipo de compuestos y de matriz.
6. Detalle de reactivos, estándares de referencia que se utiliza.
7. Lista de equipos y requisitos de funcionamiento y rendimiento.
8. Definir los parámetros del método.
9. Detalle de condiciones e implementación del método, incluyendo la preparación de la muestra.



¿Cómo seleccionar e implementar un método analítico nuevo?

10. Definir los procedimientos estadísticos y cálculos representativos.
11. Definir los procedimientos para el control de calidad en la rutina.
12. Definir los gráficos representativos, cromatogramas, espectros y curvas de calibración.
13. Definir los criterios de aceptación / rechazo de los datos.
14. Consideraciones de seguridad.



Etapas para desarrollar un método analítico



¿Qué requisitos debo cubrir antes de validar un método analítico?



Instrumentos
calificados



Analistas
calificados



Métodos
Documentados



Integridad de
la muestra



Patrones de
referencia
confiables



Plan maestro
de validación

Qué son los parámetros del desempeño del método analítico

Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen exactitud, efecto matricial, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, sensibilidad, robustez, fortaleza y otras características relacionadas con los resultados obtenidos por el método.



¿Qué parámetros del desempeño se determinan en cada método analítico?

Parámetros de los procedimientos analíticos fisico-químicos y potencia microbiológica, según ICH.

| Categoría de prueba Parámetro de desempeño | Categoría I | Categoría II | | Categoría III | Categoría IV |
|---|------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------|
| | Principio(s) activo(s) | Prueba de límite Cuantitativa | Prueba de límite Cualitativa | Físico químico desempeño | Identificación |
| Exactitud | SI | SI | * | * | NO |
| Precisión | SI | SI | NO | SI | NO |
| Especificidad | SI | SI | SI | * | SI |
| Límite de Detección | NO | NO | SI | * | NO |
| Límite de Cuantificación | NO | SI | NO | * | NO |
| Linealidad | SI | SI | NO | * | NO |
| Intervalo | SI | SI | * | * | NO |

* Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del ensayo.

¿Qué parámetros del desempeño se determinan en cada método analítico?

Según la USP 34:

| Características de Desempeño analítico | Categoría I de valoración Prod.Termi. Graneles, conservante | Categoría II de valoración | | Categoría III de valoración (características de desempeño, disolución) | Categoría IV de valoración (pruebas de identificación) |
|--|---|---|--|--|--|
| | | Prueba de límite Cuantitativa (impurezas en fármacos) | Prueba de límite Cualitativa (metales pesados, etc.) | | |
| Exactitud | SI | SI | * | * | NO |
| Precisión | SI | SI | NO | SI | NO |
| Especificidad | SI | SI | SI | * | SI |
| Límite de detección | NO | NO | SI | * | NO |
| Límite de cuantificación | NO | SI | NO | * | NO |
| Linealidad | SI | SI | NO | * | NO |
| Intervalo | SI | SI | * | * | NO |

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza de la prueba específica

¿Qué parámetros del desempeño se determinan en cada método analítico?

Parámetros de desempeño de los procedimientos microbiológicos

| Parámetro de desempeño / Tipo de prueba | Límite microbiano y detección de microorganismos patógenos | Esterilidad | Efectividad antimicrobiana |
|--|---|--------------------|-----------------------------------|
| Efectividad del medio de cultivo (Promoción de crecimiento) | SI | SI | SI |
| Efectividad del método de neutralización de los agentes preservantes | SI | SI | SI |

Extensión de la Validación

- **Métodos nuevos requieren validación completa**
- **Métodos de Farmacopea o referencias oficiales, requieren validación parcial (o verificación)**
- **Cambios significativos implican revalidación parcial**
 - cambios de equipo
 - cambios de fórmula
 - cambios de proveedores de reactivos críticos



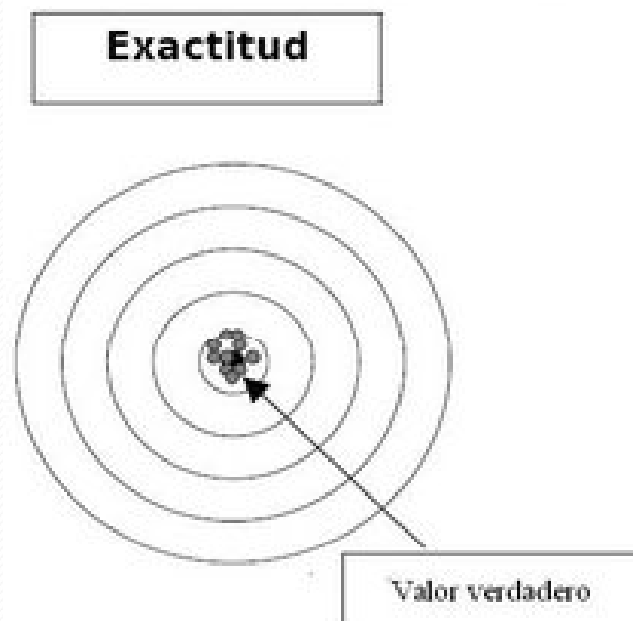
Qué son los parámetros del desempeño del método analítico

Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen exactitud, efecto matricial, repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, rango, sensibilidad, robustez, fortaleza y otras características relacionadas con los resultados obtenidos por el método.



EXACTITUD DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

- **EXACTITUD:** Proximidad de la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero del mensurando



Estimación de la Exactitud

5 maneras de determinar la exactitud

1 Prueba de un Estándar de Referencia

2 Mezcla con excipientes (placebo con una cantidad agregada conocida)

3 Adición de estándar (muestra con cantidad agregada de St. conocida)

4 Se deduce a partir de los datos de especificidad y linealidad.

5 Comparación con un método reconocido como exacto (método de referencia)

Estimación de la Exactitud

1. Agregando cantidad conocida del estándar al producto
 - a. Determinar por duplicado el contenido promedio del analito en la muestra con el método a validar.
 - b. Enriquecer las muestras con estándar: para preparar las soluciones, se mantiene constante la cantidad de muestra tomada y se agregan cantidades variables del estándar.

Estimación de la Exactitud

Agregando cantidad conocida del estándar al producto

- c. La exactitud es evaluada utilizando un mínimo de nueve determinaciones, tres concentraciones y tres determinaciones de cada concentración. (por ejemplo: concentraciones de 80%, 100% y 120% de la concentración normal de trabajo del método; o 100%, 125% y 150% cuando no se puede reproducir la matriz del analito)
- d. Calcular el % de Recuperación con la fórmula:

$$\% \text{ Rec.} = (\text{valor encontrado} / \text{valor verdadero o de referencia}) * 100\%$$

Estimación de la Exactitud

Agregando cantidad conocida del estándar al producto

- **Criterio de Aceptación y Documentación:**

El porcentaje de recuperación puede estar entre 90 y 110% del valor teórico. Una recomendación es usar +/- 4 veces la desviación estándar relativa.

Para Disolución: 97% - 103%

Para Muestras biológicas: $\pm 15\%$ del valor verdadero

Estimación de la Exactitud

Agregando cantidad conocida del estándar al producto

- **Criterio de Aceptación y Documentación:**

Para Trazas:

| | |
|------------------|----------------------------|
| Menor a 100 ppb: | 60% - 110% de recuperación |
| Mayor a 100 ppb: | 80% - 110% de recuperación |
| Menos de 1 ppb: | 70% - 120% de recuperación |

- Para cada muestra, reportar el valor teórico, el valor del ensayo y el porcentaje de recuperación. Calcular el promedio, la desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el porcentaje de recuperación para todas las muestras. Llevar un registro de los resultados en una hoja de datos.

Estimación de la Exactitud

2. Comparando los resultados de un estándar o Material de Referencia Certificado

- Determinar por duplicado el valor promedio del estándar o material de referencia certificado por el método a validar. Comparar el resultado obtenido con el valor declarado.
- Tomar en cuenta la disponibilidad y estabilidad del estándar o MRC, así como la incertidumbre que tenga el valor verdadero.
- La exactitud es evaluada utilizando un mínimo de 30 determinaciones: 5 concentraciones y 6 determinaciones de cada concentración.

Estimación de la Exactitud

2. Comparando los resultados de un estándar o Material de Referencia Certificado

Criterio de Aceptación y Documentación:

- El porcentaje de recuperación puede estar entre 98 y 102% del valor teórico o 2% de error relativo. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rec.} = \left(\frac{\text{valor encontrado}}{\text{valor verdadero o de referencia}} \right) * 100\%$$

- Para cada muestra, reportar el valor teórico, el valor del ensayo y el porcentaje de recuperación. Calcular el promedio, la desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el porcentaje de recuperación para todas las muestras. Llevar un registro de los resultados en una hoja de datos.

Estimación de la Exactitud

3. Comparando los resultados con un método oficial con exactitud bien definida
 - La muestra debe ser analizada utilizando el método a validar y un segundo método bien caracterizado, el cual debe tener una exactitud bien definida y establecida.
 - Se analizan 6 muestras por duplicado a la concentración normal de trabajo por ambos métodos.

Estimación de la Exactitud

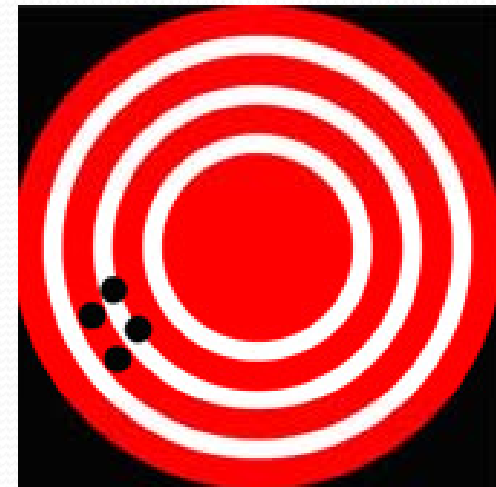
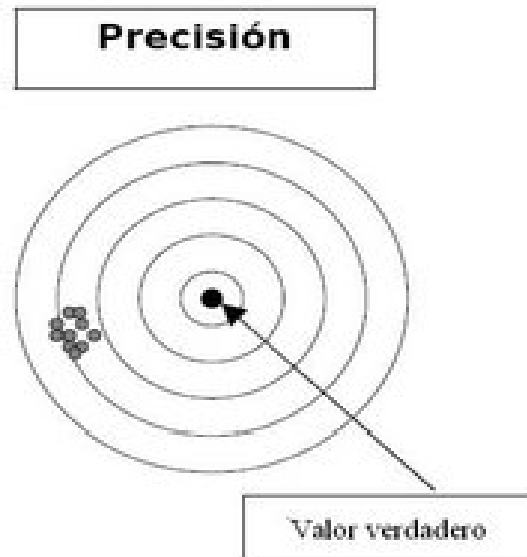
3. Comparando los resultados con un método oficial con exactitud bien definida

Criterio de Aceptación y Documentación:

- Se lleva a cabo un análisis de varianza, del porcentaje de recuperación o del error relativo en porcentaje, para determinar si hay o no diferencia significativa entre la exactitud de los métodos comparados.
- Para cada muestra, reportar el valor teórico, el valor del ensayo y el porcentaje de recuperación. Calcular el promedio, la desviación estándar, desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el porcentaje de recuperación para todas las muestras. Llevar un registro de los resultados en una hoja de datos.

PRECISIÓN DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

- **PRECISIÓN:** Es el grado de concordancia entre los resultados independientes de una medición, obtenidos en condiciones estipuladas, ya sea de repetibilidad o de reproducibilidad y depende de la distribución de los resultados sin estar relacionada con el valor verdadero.



PRECISIÓN DE LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

Hay 3 niveles para determinar la Precisión del Método:

1. **REPETIBILIDAD:** Coincidencia entre los resultados de mediciones sucesivas realizadas en las mismas condiciones de medición.
2. **REPRODUCIBILIDAD:** Coincidencia entre los resultados de mediciones realizadas en diferentes condiciones de medición en un mismo laboratorio o entre 2 laboratorios.
3. **PRECISIÓN INTERMEDIA:** Medida de la precisión de los resultados de un método en condiciones diferentes de analista, día, equipo y lote de reactivos, dentro del mismo laboratorio. No es necesario determinar precisión intermedia, cuando se ha determinado reproducibilidad.

PRECISIÓN- REPETIBILIDAD

Para determinar la precisión entre ensayos o repetibilidad, se trabaja con submuestras de una muestra homogénea, bajo las mismas condiciones medición: el mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición, en un período corto de tiempo. Hay 2 formas de determinarla:

1. Hacer un mínimo de 9 determinaciones: 3 réplicas a 3 concentraciones diferentes o 9 determinaciones al 100% de la concentración normal de trabajo.
2. hacer un mínimo de 6 determinaciones a una concentración que corresponda con la de la muestra problema.

PRECISIÓN- REPETIBILIDAD

Criterio de Aceptación y Documentación:

Se establece de acuerdo a un valor máximo aceptable para el parámetro escogido, según el tipo de análisis y su propósito específico.

Registrar los resultados en el formato de datos, así como los cálculos de la media y los parámetros de dispersión escogidos: **s**, **SDR**, **CV** o **intervalo de confianza**.

PRECISIÓN INTERMEDIA

Se determina realizando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración esperada. (Diferentes días, analistas y equipo).

Criterio de Aceptación y Documentación:

RSD < 2,0% para macrocomponentes

RSD < 10,0% para componentes menores

RSD < 3,0% para métodos empleados en disolución

RSD < 10% para muestras biológicas

Registrar los resultados, así como los cálculos de la media, la desviación estándar, la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el intervalo de confianza.

PRECISIÓN-REPRODUCIBILIDAD

Se determina realizando un mínimo de seis determinaciones al 100% de la concentración esperada. (Se realiza las determinaciones analizando en diferentes días, por diferente analista, horas del día, equipos).

Criterio de Aceptación y Documentación:

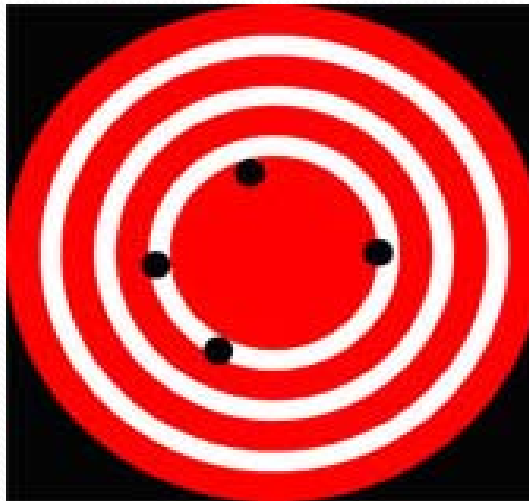
Se espera una variabilidad mayor, que para el caso de la repetibilidad.

Registrar los resultados, así como los cálculos de la media, la desviación estándar, la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) y el intervalo de confianza.

No se realiza precisión intermedia cuando se estima la reproducibilidad.

ERROR EN LOS RESULTADOS ANALÍTICOS

- **ERROR:** Resultado de una medición menos un valor verdadero del mensurando.



Determinación de Exactitud y de Precisión del método analítico

- La norma ISO- 5725 nos describe las consideraciones que se deben tomar en cuenta para determinar la exactitud y la precisión de una medición:
 - ✓ Contar con un método establecido.
 - ✓ El número de factores que cambiarán en la determinación.
 - ✓ El alcance de medición.
 - ✓ El número de puntos a realizar.
 - ✓ La disponibilidad de los materiales y quipos.
 - ✓ El número de repeticiones.
 - ✓ Cronograma para realizar las mediciones.

ESPECIFICIDAD

Es la habilidad que muestra un método para distinguir entre un analito e impurezas conocidas, precursores sintéticos, metabolitos, o productos de degradación. Esta se muestra en su resolución hacia estos componentes.

- **Documentación**

Imprimir cromatogramas o datos que muestren la resolución de un método.

- **Criterio de Aceptación**

Los componentes contaminantes no deben interferir con el análisis del analito en cuestión. .

LÍMITE DE DETECCIÓN

Determinar la menor concentración a la que se detecte el analito en la matriz de la muestra.

- **Documentación**

Imprimir el cromatograma o registrar la menor concentración detectable en una hoja de registro.

- **Criterio de Aceptación**

No hay un límite de detección mínimo. Sin embargo, para métodos cromatográficos el límite superior suele ser un valor de al menos tres veces la línea base (o nivel de ruido). Para otros instrumentos puede ser el límite de operación del instrumento, según lo haya establecido el fabricante.

Canadian Health Protection Branch (CHPB) establece una razón de 3:1 entre la señal y el ruido.

LÍMITE DE DETECCIÓN

Para Métodos No Instrumentales:

- Se preparan 10 blancos independientes y 10 blancos enriquecidos a la concentración más baja aceptada. Una vez preparadas las soluciones, se llevan a cabo las mediciones de cada una y posteriormente se calcula la desviación estándar de cada grupo de datos.
- Con estos datos se puede calcular el límite de detección:

$$LD = \text{Valor promedio del blanco} + 3S$$

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Determinar la menor concentración en la que un analito en la matriz/muestra puede ser determinada con la exactitud y precisión requeridas para el método en particular. Este valor puede ser la menor concentración en la curva del patrón.

- **Documentación**
- Imprimir el cromatograma o anotar el dato de la menor concentración cuantificable en la hoja de datos. Proveer datos que demuestren exactitud y precisión requeridas en el criterio de aceptación.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

- **Criterio de Aceptación**

El límite de cuantificación para métodos cromatográficos es la concentración que proporciona una razón señal a ruido, con una relación de 10 a 1 y que es menor o igual a 10% de la precisión, o una relación de 20 a 1 y es menor o igual a 5% de la precisión.

En el límite de cuantificación, se deben cumplir los criterios de aceptación de exactitud y linealidad. CHPB establece que el límite de cuantificación es el mejor estimado de una concentración baja, que derive en una desviación estándar relativa de aproximadamente 10%, en, al menos, seis réplicas.

LINEALIDAD

Capacidad de un método analítico para generar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito o valor del parámetro de la muestra, dentro de un rango.

- Hay 2 formas de determinar la linealidad:
 1. Preparar soluciones patrón de por lo menos cinco diferentes concentraciones del estándar, que estén distribuidas regularmente y que cubran del 80%-120% o 50%-150%, del intervalo de trabajo esperado, con diluciones a partir de una misma solución madre y analizando en duplicado para cada dilución, o realizando por duplicado la solución madre y analizando 1 vez cada dilución.

LINEALIDAD

2) Usar seis réplicas por concentración. Analizar las soluciones conforme el método en cuestión.

- **Criterio de Aceptación y Documentación:**

La curva de calibración se grafica colocando las concentraciones de las soluciones en el eje horizontal (x) y las respuestas del instrumento en el eje vertical (y), esta relación debe ser lineal con un coeficiente de determinación (r^2) de por lo menos 0.98. (Es preferible 0.99). Los valores deben caer dentro de una zona horizontal angosta, los que queden fuera no son aceptables para ser incluidos en el intervalo normal de trabajo.

En donde:

LINEALIDAD

- CV menor o igual a 2.0% (desviación estándar relativa o coeficiente de variación)
- r mayor o igual a 0.99 (el coeficiente de correlación es una medida del grado de asociación entre las mediciones y la concentración del analito)
- r^2 mayor o igual a 0.98 (el coeficiente de determinación mide la exactitud con la que se ajusta la curva de regresión a los valores experimentales de y)
- b aproximadamente igual a 0 (intercepto de la línea)
- m igual a la sensibilidad del sistema (pendiente de la línea)

Evaluación de la Linealidad

Linealidad

de un analito en un material

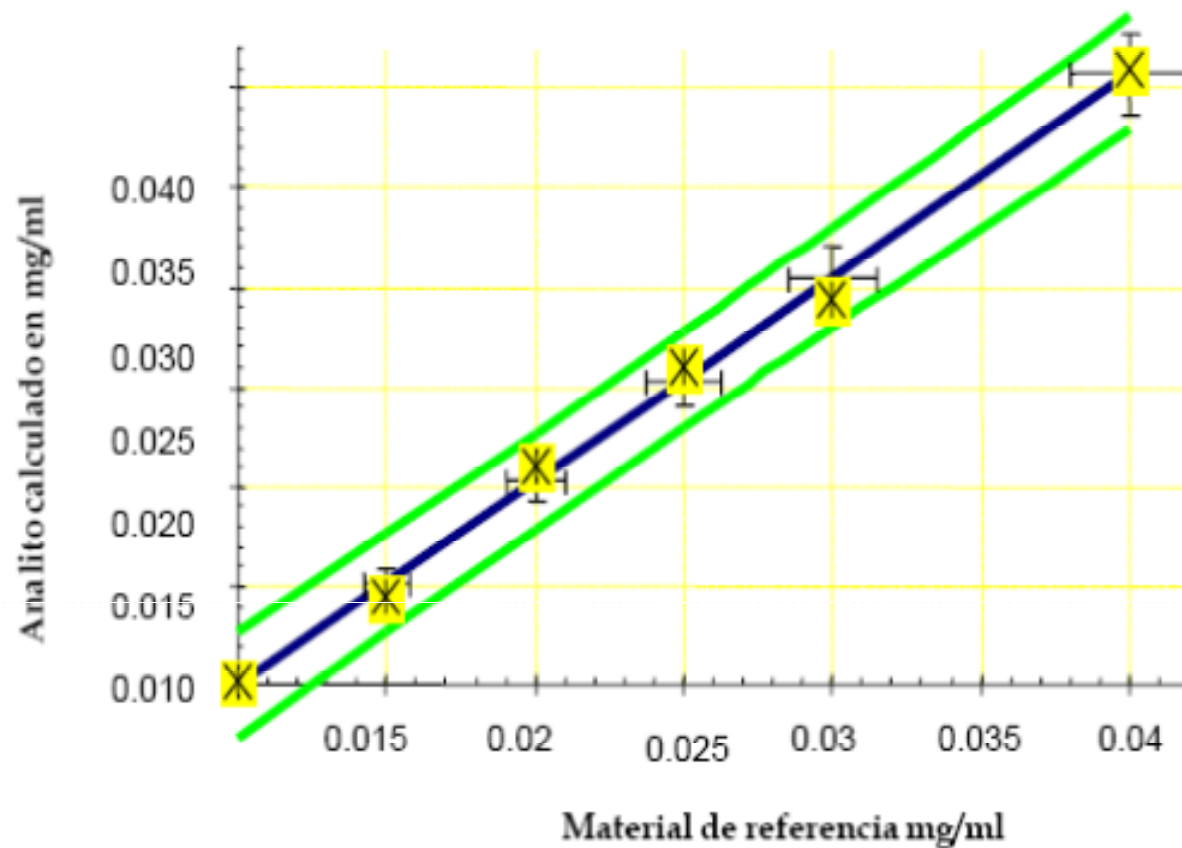
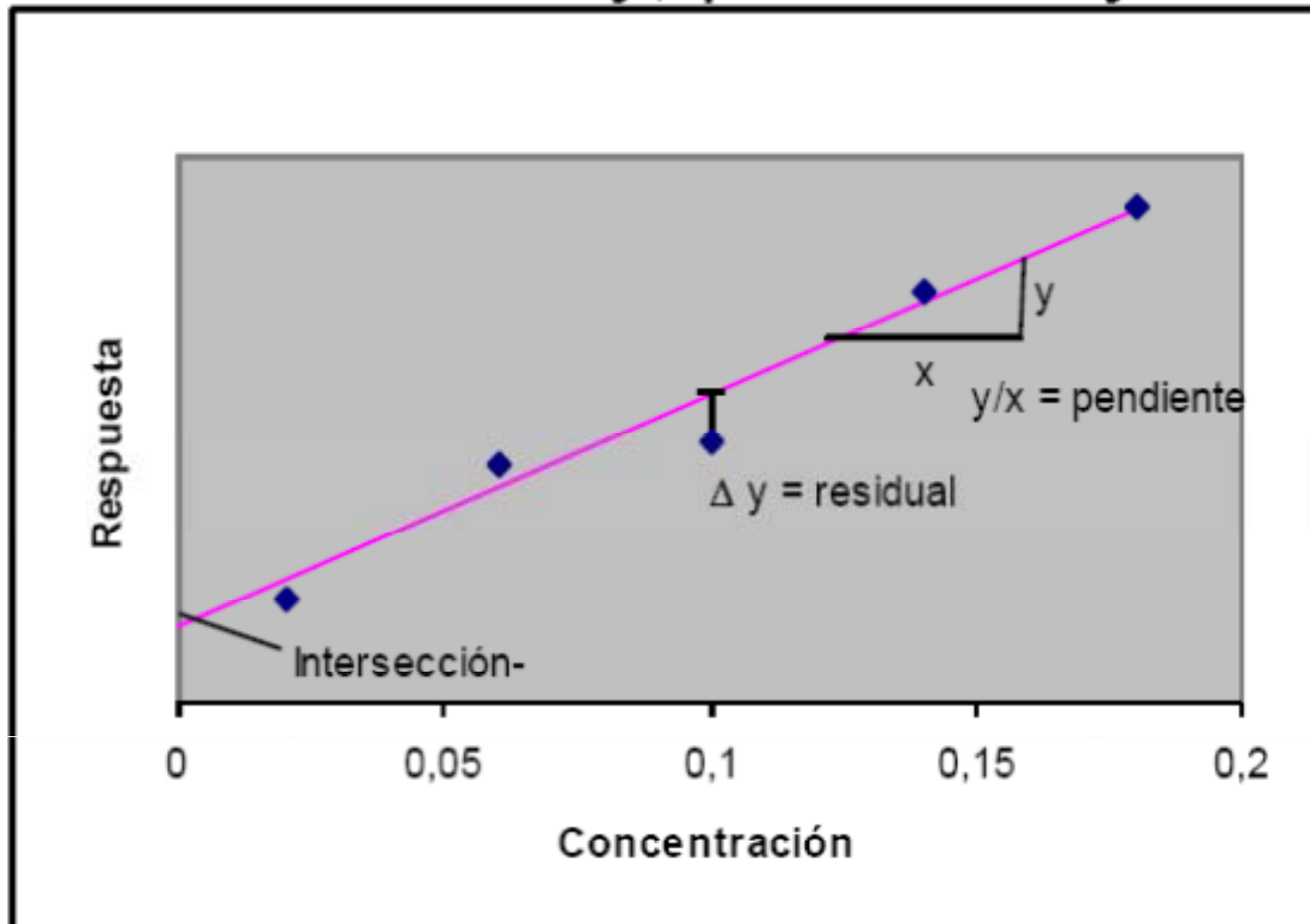


Tabla de valores (x,y)

| # | Material de referencia mg/ml (x) | Material de referencia mg/ml (y) |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 0.0100 | 0.0101 |
| 2 | 0.0150 | 0,0155 |
| 3 | 0.0200 | 0,0207 |
| 4 | 0.0250 | 0.0256 |
| 5 | 0.0300 | 0.0298 |
| 6 | 0.0400 | 0.0401 |

Evaluación de la Linealidad

■ Intersección-y, pendiente y residuales



RANGO O INTERVALO

Intervalo entre la concentración máxima y mínima de analito en la cual se puede determinar al analito con un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad utilizando el método en cuestión.

- a) Procedimiento:
- Verificar que el método analítico proporciona linealidad, precisión y exactitud aceptables cuando se aplica a muestras que contienen el analito en los extremos y dentro del intervalo.

RANGO O INTERVALO

- Deben considerarse los rangos especificados mínimos que se indican a continuación:
- Valoración de macrocomponentes 80-120% de la concentración de prueba
- Uniformidad de contenido 70-130% o el intervalo más apropiado según la Monografía.
- Prueba de disolución $\pm 20\%$ por encima del intervalo especificado.
- Cuantificación de impurezas LC o 50%- 120%

RANGO O INTERVALO

Criterio de Aceptación y Documentación:

- Determinar que los niveles de precisión, exactitud y linealidad de las mediciones utilizando el método a validar, en el rango de las concentraciones del analito cumple con su respectivo criterio de aceptación.



VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Validar métodos microbiológicos requiere:

1. Comparar con un **MÉTODO DE REFERENCIA**.
2. Usar cepas de referencia y cepas de referencia certificadas.(Material de referencia).
3. **LA EVALUACIÓN SISTEMÁTICA DE FACTORES**.
4. **Ensayos Interlaboratorios**.
5. La estimación de la incertidumbre.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Límite de detección

El número más bajo de microorganismos que pueden ser detectados, pero en números que no pueden ser estimados exactamente.

Límite de cuantificación

Aplicado a pruebas microbiológicas cuantitativas. El número más bajo de microorganismos, dentro de una variabilidad definida, que pueden ser contados bajo las condiciones experimentales del método bajo evaluación.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Cultivos de referencia

Termino colectivo para la cepa de referencia y los stocks de referencia.

Material de referencia

Material suficientemente homogéneo y estable en relación a una o más propiedades especificadas, el cual ha sido establecido como idóneo para el uso previsto, en un proceso de medición.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Sensibilidad

La fracción del número total de cultivos positivos o colonias correctamente asignadas en una presunta inspección (7).

Especificidad (selectividad)

La habilidad del método para detectar el rango requerido de microorganismos que podrían estar presentes en la muestra.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Los métodos de ensayos estandarizados se consideran validados. Sin embargo, el método de ensayo específico para ser utilizado por un determinado laboratorio para el análisis de un producto específico necesita mostrar que es adecuado para su uso en la recuperación de bacterias, levaduras y mohos en la presencia del producto específico.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

El laboratorio debe demostrar que los criterios de desempeño del método de ensayo estándar pueden ser satisfechos por el laboratorio antes de introducir el ensayo con propósitos de rutina (método de verificación) y que el método de ensayo específico para el producto específico es adecuado (adecuación del método de ensayo incluyendo controles positivos y negativos).

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Los métodos de ensayo no basados en compendios u otras referencias reconocidas deben ser validados antes de su uso. La validación debe incluir, cuando sea apropiado, determinación de la exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y robustez. Potenciales efectos inhibitorios de la muestra deben ser tomados en cuenta al ensayar los diferentes tipos de muestra. Los resultados deben ser evaluados con métodos de estadística apropiados, como se describe en las farmacopeas nacionales, regionales o internacionales.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Control de calidad interna

El laboratorio debe contar con un sistema de aseguramiento de calidad interna o control de calidad (por ejemplo: manejo de desviaciones, uso de muestras adicionales, réplicas de ensayos, participación en ensayos de aptitud) para asegurar la consistencia de resultados rutinarios y su conformidad de acuerdo a un criterio establecido.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Control de calidad interna

La validación de métodos microbiológicos se realiza especialmente utilizando los resultados del control interno de la calidad, se estima la repetibilidad y la reproducibilidad.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Validar métodos microbiológicos requiere:

1. Comparar con un **MÉTODO DE REFERENCIA.**
2. Usar cepas de referencia y cepas de referencia certificadas.(Material de referencia).
3. **LA EVALUACIÓN SISTEMÁTICA DE FACTORES.**
4. **Ensayos Interlaboratorios.**
5. **La estimación de la incertidumbre.**

Definiciones y Fórmulas usadas en la Validación de Métodos

1. Desviación Estándar

Es la medida de cómo se dispersan los valores alrededor de la media en la distribución de valores. Se calcula con la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n - 1} \sum_{i=0}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}$$

En donde: n es el número de valores

Definiciones y Fórmulas usadas en la Validación de Métodos

2. DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA REPETIBILIDAD

Es la desviación estándar de los resultados de los análisis obtenidos bajo condiciones de repetibilidad.

$$s_I = \sqrt{\frac{1}{N - k} \sum_{i=1}^k (n_i - 1) s_i^2} \quad \partial$$

En donde n es el número de valores

N es el número de repeticiones

k es el factor de cobertura, se utilizará $k = 2$, con un nivel de confianza del 95%

s_i^2 es el cuadrado de la desviación estándar

Definiciones y Fórmulas usadas en la Validación de Métodos

3. DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LA REPRODUCIBILIDAD (total)

La desviación estándar de los resultados de análisis obtenidos bajo condiciones de reproducibilidad.

$$\overline{s} = \sqrt{\frac{(N - k) \cdot s_I^2 + (k - 1) \cdot s_Z^2}{N - 1}}$$

En donde N es el número de repeticiones
 k es el factor de cobertura, se utilizará $k = 2$, con un nivel de confianza del 95%
 s_i^2 es el cuadrado de la desviación estándar
 s_Z^2 es el cuadrado de la desviación estándar entre las repeticiones o series

Definiciones y Fórmulas usadas en la Validación de Métodos

4. DESVIACIÓN ESTÁNDAR RELATIVA (RSD)

Es la comparación de la desviación estándar con respecto a la media, generalmente se expresa en % y se denomina como Coeficiente de Variación. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

En donde s es la desviación estándar

\bar{x} es el promedio de las mediciones

Definiciones y Fórmulas usadas en la Validación de Métodos

5. PRECISIÓN INTERMEDIA

Medida de la precisión de los resultados de un método de ensayo en condiciones diferentes de analista, día, equipo y lote de reactivos, dentro del mismo laboratorio con la misma muestra homogénea.

$$s_Z = \sqrt{\frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^k n_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2}$$

En donde

n es el número de valores

k es el factor de cobertura, se utilizará $k = 2$, con un nivel de confianza del 95%

s_Z es la desviación estándar entre las repeticiones o series

\bar{x} es el promedio de las mediciones

Protocolo de Validación

Protocolo de validación para método analítico

- Declaración de propósito y alcance
- Responsabilidades
- Método de ensayo documentado
- Lista de materiales y equipos
- Procedimiento para los experimentos para cada parámetro
- Análisis estadístico
- Criterio de aceptación para cada parámetro de desempeño



Componentes de la Calidad de los análisis

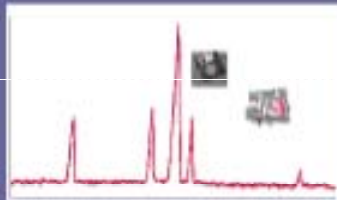
Verificación del CC (calibración, materiales de referencia)



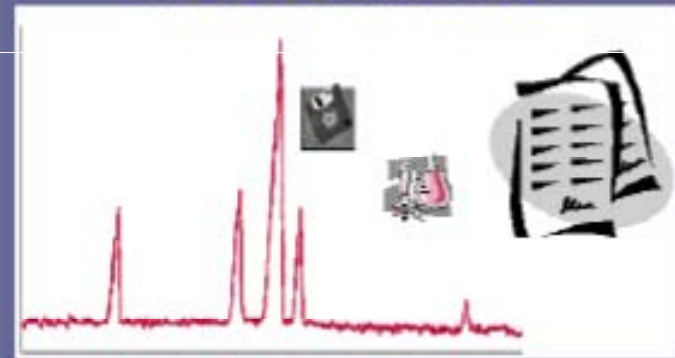
Calificación de los instrumentos analíticos



Pruebas de aptitud del sistema



Validación de los métodos analíticos





MUCHAS GRACIAS